

<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> : <b>C12Q 1/68</b></p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/58505</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 5. Oktober 2000 (05.10.00)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/07127</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 27. September 1999 (27.09.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 199 15 141.5      26. März 1999 (26.03.99)      DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ARTUS GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK UND ENTWICKLUNG MBH [DE/DE]; Gerstäckerstrasse 9, D-20459 Hamburg (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KRUPP, Guido [DE/DE]; Wannseebogen 30A, D-24111 Kiel (DE).</p> <p>(74) Anwälte: WEBER-QUITZAU, Martin usw.; Uexküll &amp; Stol- berg, Beselerstrasse 4, D-22607 Hamburg (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>	
<p>(54) Title: DETECTION OF NUCLEIC ACID AMPLIFIED PRODUCTS</p> <p>(54) Bezeichnung: DETEKTION VON NUKLEINSÄURE-AMPLIFIKATEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention especially relates to methods for the amplification and quantitative real time detection of nucleic acids and to kits for carrying out said method.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die vorliegende Patentanmeldung betrifft insbesondere Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren sowie Kits zur Durchführung der Verfahren.</p>		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

### Detektion von Nukleinsäure-Amplifikaten

Die vorliegende Patentanmeldung betrifft insbesondere Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren sowie Kits zur Durchführung der Verfahren.

5 Zur Vervielfältigung von Desoxyribonucleinsäuren (DNA) oder Ribonucleinsäuren (RNA) wurden bislang verschiedene Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT), wie zum Beispiel Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA<sup>®</sup>), entwickelt. Auf diesen Amplifikationstechniken  
10 basierende Assays werden beispielsweise für den hochsensitiven Nachweis und/oder die Quantifizierung von Erregern im medizinisch-diagnostischen Bereich eingesetzt.

DNA-Amplifikationstechniken wie PCR führen zur Erzeugung großer  
15 Mengen amplifizierter Target-DNA (oder über einen initialen Reverse Transkriptase-Schritt zu amplifizierter RNA). Üblicherweise werden die Amplifikationsprodukte nach einer definierten Zeit mit Hilfe von Post-Amplifikationsmethoden - im allgemeinen durch Hybridisierung - nachgewiesen (Endpunktanalyse).

20

Gemäß einem neuen Ansatz - "TaqMan<sup>®</sup>" - zur quantitativen PCR wird Fluorescence Resonance Transfer (FRET; vgl. Heid et al., Genome Res. 6 (1996) 986-994) mit doppelt fluoreszenzmarkierten DNA-

Sonden zur Echtzeitdetektion der DNA-Amplifikation vorgeschlagen). Ein Nachteil dieser Methode ist, daß die Sonde am Target haften bleibt, bis sie durch die 5'-Exonuklease-Aktivität der Taq DNA-Polymerase entfernt wird. Die Stringenz ist aufgrund des 5 Temperaturprofils der PCR nur sehr schwer kontrollierbar, und die Lösung dieses Problems durch entsprechende Sondenkonstruktion ist nur unter großem Aufwand denkbar. Ein weiterer Nachteil des TaqMan<sup>®</sup> ist die Erzeugung eines äquimolaren Signals, d.h., daß pro Amplifikationszyklus nur ein Sondenmolekül pro amplifiziertem 10 DNA Target-Molekül gespalten wird, was ein vergleichsweise schwaches Signal zur Folge hat.

Bei NASBA<sup>®</sup> handelt es sich - im Gegensatz zur thermozyklischen PCR - um eine homogene, isotherme *in vitro* Amplifikation (vgl. 15 z.B. T. Kievits et al, J. Vir. Meth. 35 (1991) 273-286), EP 0 329 822 sowie R. Sooknanan et al. in "Molecular Methods for Virus Detection", D.L. Wiedbrauk und D.H. Farkas (Ed.), Academic Press 1995, Kapitel 12, 261-285). Gegenüber anderen Amplifikationsverfahren weisen die NASBA<sup>®</sup> und andere isotherme Reaktionen den 20 Vorteil auf, daß sie ohne besonderen technischen Aufwand durchgeführt werden können, da die Amplifikation bei einem einzigen Temperaturwert erfolgt und diese Reaktionsbedingungen während des gesamten Prozesses beibehalten werden. Damit verkürzt nicht auch die Dauer jedes Amplifikationsschrittes. In Verbindung 25 mit der z.B. im Vergleich zur PCR hohen Amplifikationseffizienz werden so mit Hilfe der NASBA<sup>®</sup> und anderer isothermer Amplifikationstechniken hohe Amplifikat-Konzentrationen in kurzer Zeit erreicht. Ein weiterer Vorteil der NASBA<sup>®</sup> gegenüber der PCR ergibt sich aus der selektiven Nachweismöglichkeit von RNA. Dies 30 spielt insbesondere im Zusammenhang mit der Amplifikation bzw. Quantifizierung von zellulärer mRNA eine Rolle, bei der mögliche zelluläre DNA-Kontaminationen vermieden werden können.

Ein Nachteil der NASBA<sup>®</sup> und anderer isothermer Amplifikations- 35 strategien ist jedoch, daß eine Echtzeitdetektion mit Hilfe von Fluoreszenz wie bei dem auf PCR basierenden TaqMan<sup>®</sup> (Perkin Elmer) oder Light-Cycler (Roche Diagnostics) nicht möglich ist.

Die in diesem Zusammenhang vorgeschlagene Endpunktanalyse zur Quantifizierung ist mit Schwierigkeiten verbunden, da im Falle des Nachweises unterschiedlicher Target-RNA-Konzentrationen manche Proben bereits das Sättigungsniveau (Plateauphase) erreicht haben können, während sich andere Proben noch in der Phase steigender Amplifikat-Konzentrationen befinden (vgl. auch Heid et al., a.a.O.). Ferner ist diese Endpunktsanalyse aufgrund zusätzlicher Arbeitsschritte nach der erfolgten RNA-Amplifikation aufwendiger und zeitintensiver. Aufgrund des Erfordernisses, die Reaktionsgefäße für die Quantifizierungsschritte zu öffnen, besteht außerdem das Risiko einer Kreuzkontamination hoch-amplifizierter RNA- und DNA-Targets.

Von Leone et al. (Nucleic Acids Research 26 (1998) 2150-2155) wurde ein Ansatz zur Echtzeitdetektion von NASBA<sup>®</sup>-amplifizierter RNA vorgeschlagen, bei dem man eine zweifach fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde verwendet. Im Gegensatz zum PCR-Verfahren (vgl. Heid et al., a.a.O.) haftet die Sonde am Target an und wird bei der Amplifikationsreaktion nicht entfernt. Dies führt zu potentiellen Komplikationen, da die DNA-Sonden während der frühen Amplifikationsstufen mit der Bindung an die ersten Antisense-RNA-Amplifikate interferieren können, was zum RNase H-Abbau und damit zu Eliminierung von RNA-Substraten und in der Folge zu einer fehlerhaften Konzentrationsbestimmung führen kann. Die Genauigkeit der quantitativen Target-Bestimmung hängt ferner in entscheidendem Maß von der Menge der zugesetzten Sonde ab.

Das von Leone et al. vorgeschlagene System erlaubt allerdings nur eine sehr schlechte Quantifizierung, unabhängig davon, ob man die bevorzugte Auswertung auf Basis des Schwellenwerts (vgl. Leone et al., Figur 7; Kurven für 100 fg und 1 pg überlappen zu Beginn) oder nach Erreichen des Plateaus (vgl. Leone et al., Figur 7; Kurven für 1 pg und 10 pg überlappen am Ende) durchführt.

Ferner ist nur eine sehr geringe Stringenz möglich, da die Sonde am Target haften bleibt und die isotherme Reaktion bei relativ geringer Temperatur (41° C) erfolgt, was ein hohes Risiko falsch

positiver Ergebnisse zur Folge hat. Offensichtlich könnte, abhängig von der Sonde, ein maximales Signal sogar bei geringeren Temperaturen erhalten werden (vgl. Leone et al., Figur 7), aber aufgrund der gewählten Versuchsdurchführung hätte dies ein  
5 zusätzliches Risiko für falsch positive Resultate zur Folge. Wie im Rahmen weiterer Untersuchungen anhand des von Leone et al. vorgeschlagenen Protokolls festgestellt wurde, variiert die optimale Temperatur für die Hybridisierung des Fluoreszenzmarkers in Abhängigkeit von der Länge bzw. der Sequenz des hybridisierenden Target-Abschnitts.  
10

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Verfahren zur Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren, insbesondere von RNA, zur Verfügung zu stellen, das die Nachteile der im Stand der  
15 Technik bekannten Methoden, insbesondere des Verfahrens von Leone et al., vermeidet und für Routineanwendungen geeignet ist.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe durch Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5 gelöst.

20

Die vorliegende Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren, bei dem man

- 25     a) einen Primer verwendet, an den eine Nukleinsäure-Sequenz, vorzugsweise mit einer Länge von 1 bis 40 Nukleotiden, angehängt ist, der für das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) im Transkript kodiert, wobei man
- 30     b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses, vorzugsweise in einer Konzentration von 50 bis 500 nM, einer Nukleinsäure-Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül  
35 ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man

- c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration »C<sub>rel.</sub>« nach folgender Formel bestimmt:

$$C_{rel.} = t_p / t_{Ref.}$$

wobei

10

t<sub>p</sub> der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

15

t<sub>Ref.</sub> der für eine Referenz-Nukleinsäure bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

- 20 Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren, das aufgrund des über den Primer eingeführten bzw. an die Nukleinsäureamplifikate angehängten Sequenzmotivs A und des in der Sonde verwendeten Motivs B die Bildung eines Hammerkopf-Ribozyms ermöglicht, kommt es zur Spaltung der Sonde und damit zur Erzeugung eines Fluoreszenzsignals. Das erfindungsgemäße Prinzip ist schematisch in Fig. 1 (sowie Fig. 2 bis 16) dargestellt. Erfindungsgemäß ist es selbstverständlich möglich, Sequenzen auszunutzen, die anstelle des Hammerkopf-Ribozyms zur Ausbildung anderer, kleinerer Ribozyme (z.B. des "Hairpin-Ribozyms" oder des "Hepatitis Delta")  
30 geeignet sind.

- Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich besonders zur Quantifizierung von RNA, DNA oder RNA/DNA-Chimären (d.h. Ribonukleotiden und Desoxyribonukleotiden enthaltenden Nukleinsäuren), die als  
35 "Target-Nukleinsäure" bezeichnet werden, wobei gegebenenfalls eine dem Verfahren vorgeschaltete Aufschmelzung doppelsträngiger Nukleinsäuren zum Erhalt von Einzelsträngen erforderlich ist.

- Bei den im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeigneten Amplifikationsverfahren handelt es sich vorzugsweise um isotherme Amplifikationsverfahren wie NASBA<sup>®</sup>, Transcription Mediated Amplification (TMA; vgl. z.B. M. Hirose et al., J. Clin. Microbiol. 36 (1998) 3122-6) oder Self-sustained Sequence Replication (3SR; vgl. E. Fahy et al. in PCR Methods and Applications, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1991, 25-33) oder um cyclische Amplifikationsverfahren wie z.B. PCR.
- 10 Soweit hierin nichts anderes angegeben ist kann es sich bei den Nukleotiden A, C und G jeweils um Ribonukleotide (rNTP) oder Desoxyribonukleotide (dNTP) handeln. "N" kann für ein beliebiges Ribo- oder Desoxyribonukleotid stehen. Im Falle von RNA/DNA-Chimären (d.h. Oligonukleotiden, die sowohl Ribo- als auch Desoxyribonukleotide enthalten) sind die obligatorischen Ribonukleotide mit dem Präfix "r" versehen (d.h. rA, rC, rG) bzw. U. Die Sequenzmotive A und B der Sonden können somit entweder ausschließlich aus Ribonukleotiden (RNA-Sonde) bestehen oder RNA/DNA-Chimäre sein. Beim Motiv A ist es jedoch erforderlich, daß am 3'-Ende in jedem Fall das Ribonukleotid Adenin (rA) eingesetzt wird (d.h. 5'-GAA(rA)-3'). Beim Motiv B (5'-CUGANGA-3') ist es erforderlich, daß Guanin als Ribonukleotid vorliegt und Adenin am 3'-Ende ebenfalls ein Ribonukleotid (rA) ist (d.h. 5'-CU(rG)AN(rG)(rA)-3'). U kann gegebenenfalls durch T ausgetauscht sein.

Unter "Fluoreszenz-Schwellenwert" wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Fluoreszenz-Wert verstanden, der um den Faktor 5-10 über der unter vergleichbaren Bedingungen (d.h. Reaktionsmischung ohne Target- oder Referenz-Nukleinsäure) gemessenen Hintergrundschwankung liegt.

Die Zeit  $t_p$  entspricht derjenigen Zeit, die nach Start der Amplifikationsreaktion vergeht, bis soviele Amplifikate der Target-Nukleinsäure gebildet sind, daß der Fluoreszenz-Schwellenwert (Schwellenwert) erreicht ist.



Die Zeit  $t_{\text{Ref.}}$  entspricht derjenigen Zeit, die nach Start der Amplifikationsreaktion vergeht, bis ausgehend von einer Referenz-Nukleinsäure bekannter Konzentration so viele Amplifikate gebildet sind, daß der Schwellenwert erreicht ist. Die Referenznukleinsäure sollte in ihrer Nukleinsäuresequenz nur geringfügig von der Target-Nukleinsäuresequenz abweichen, damit eine möglichst genaue Quantifizierung erreicht wird.

Um die Konzentration der Target-Nukleinsäure möglichst exakt bestimmen zu können mißt man vorzugsweise mehrere  $t_{\text{Ref.}}$ -Werte für Referenz-Nukleinsäuren unterschiedlicher Konzentration, so daß der gemessene  $t_p$ -Wert möglichst zwischen zwei  $t_{\text{Ref.}}$ -Meßpunkten liegt und somit eine bestimmte Konzentration zugeordnet werden kann. Vorzugsweise mißt man drei  $t_{\text{Ref.}}$ -Werte für eine Referenz-Nukleinsäure bei drei unterschiedlichen Konzentrationen und ermittelt die sich daraus ergebende Meßkurve (Eichkurve). Die Target-Nukleinsäure unbekannter Konzentration kann anschließend durch Bestimmung des  $t_p$ -Wertes durch Vergleich mit der Eichkurve bestimmt werden.

20

Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung wird das Verfahren durchgeführt, indem man die Target-Nukleinsäure in gleichzeitiger Anwesenheit einer oder mehrerer, vorzugsweise von drei Referenz-Nukleinsäuren bekannter Konzentration durchführt, und zur Detektion verschiedene sequenzspezifische, fluoreszenzmarkierte Sonden verwendet, die ein unterschiedliches Fluoreszenzsignal erzeugen. Die Sequenzen der Referenz-Nukleinsäuren in einem Amplifikationsansatz unterscheiden sich nur geringfügig voneinander und sollten Varianten der Target-Nukleinsäure sein.

30 Auf diese Weise können in einem Reaktionsansatz die  $t_p$ - und  $t_{\text{Ref.}}$ -Werte gleichzeitig bestimmt und somit ohne zusätzlichen Arbeitsaufwand die Konzentration ( $c_{\text{rel.}}$ ) der Target-Nukleinsäure bestimmt werden (sogen. "Multiplexing"; vgl. auch US 5,837,501).

35 Anstelle der Verwendung eines das Sequenzmotiv A enthaltenen Primers und einer das Sequenzmotiv B enthaltenden Sonde ist auch die umgekehrte Kombination gleichermaßen geeignet, d.h. die

Kombination aus einem das Motiv B enthaltenden Primer und einer das Motiv A enthaltenden Sonde.

Als Reporter kommen praktisch alle Fluoreszenz-Farbstoffe und insbesondere die in Tab. III angegebenen Farbstoffe (vor allem FAM, HEX, TET, ALEXA, Texas Red, Light Cycler Red, IRD 700, CY-7, IRD 41 oder La Jolla Blue (TIB MOLBIOL) in Frage. Vorzugsweise handelt es sich bei den Reporter-Farbstoffen um Substanzen mit hohem Fluoreszenzsignal (d.h. hoher "Lichtausbeute") bei geringem "Photobleaching".

Als Quencher können Farbstoffe eingesetzt werden, die bei Wellenlängen > ca. 500 nm absorbieren. Unter den in Frage kommenden Substanzen sind TAMRA, LCR, CY-5 oder DABCYL bevorzugt.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind Reporter/Quencher-Kombinationen bevorzugt, die eine Anregung bei ca. 490 nm und eine Emission bei < ca. 650 nm (TagMan<sup>®</sup> SDS 7700, Perkin Elmer) oder < 700 (Light Cycler, Boehringer) gestatten. Die Fluoreszenz kann praktisch mit jedem handelsüblichen Fluorimeter gemessen werden.

Beim Multiplexing bietet sich die Kombination des universellen Quenchers DABCYL mit Reporter-Farbstoffen wie Coumarin (emittierte Fluoreszenz bei 475 nm), FAM (emittierte Fluoreszenz bei 515 nm), BODIPY (emittierte Fluoreszenz bei 525 nm), TAMRA (emittierte Fluoreszenz bei 575 nm), Texas Red (emittierte Fluoreszenz bei 615 nm), CY-5 (emittierte Fluoreszenz bei 674 nm) usw. an (vgl. z.B. S. Tyagi et al., Nature Biotech. 16 (1998) 49-53).

Sollte die zu amplifizierende Nukleinsäure bereits die Sequenzmotive 5'-GAAA-3' oder 5'-CUGANGA-3' ("Ribozym-Motive") enthalten, kann das Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion erfindungsgemäß ebenfalls durchgeführt werden, wobei - aufgrund des bereits in der Target-Nukleinsäure enthaltenen Ribozym-Motivs - unmarkierte Primer eingesetzt werden, d.h. Primer, an die Motiv A oder Motiv B nicht angehängt sind. Die

Detektion erfolgt schließlich, indem man die Nukleinsäure-Amplifikation - vorzugsweise NASBA<sup>®</sup>, TMA, 3SR oder PCR - in Gegenwart eines Überschusses einer Sonde durchführt, die das jeweils zum in der Target-Nukleinsäure enthaltenen Ribozym-Motiv 5 "komplementäre" Motiv enthält. Unter "komplementäres Motiv" wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Motiv verstanden, das - abhängig von dem in der Target-RNA enthaltenen Ribozym-Motiv (5'-GAAA-3' oder 5'-CUGANGA-3') zur Ausbildung einer Hammerkopf-Ribozym-Struktur (Hammerhead-Ribozym) erforderlich ist.

10

Die vorliegende Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion einer das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) oder einer das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthaltenden Nukleinsäure, bei dem man

15

a) die Sequenzen der verwendeten Primer so wählt, daß der Sequenzbereich der Nukleinsäure, der für das Motiv A im Transkript kodiert, amplifiziert wird, wobei man

20

b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses, vorzugsweise in einer Konzentration von 50 bis 500 nM, einer Nukleinsäure-Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) oder das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man

25

30

c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration »C<sub>rel.</sub>« nach folgender Formel bestimmt:

35

$$C_{rel.} = t_p / t_{Ref.},$$

wobei

5  $t_p$  der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

10  $t_{Ref.}$  der für eine Referenz-Nukleinsäure bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist somit erstmals eine quantitative Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren (d.h. RNA, DNA oder RNA-DNA-Chimären) im Rahmen einer isothermen Nukleinsäureamplifikation, z.B. mittels NASBA<sup>®</sup>, TMA oder 3SR, möglich. Im Falle der NASBA<sup>®</sup> werden insbesondere die dem System von Leone et al. (a.a.O.) anhaftenden Probleme umgangen. Ferner kommt es nicht zu einer möglichen Konkurrenz zwischen Detektion und Amplifikation, da die Sonde - eine RNA-Substratsonde - nicht am Target haften  
20 bleibt sondern abgespalten und freigesetzt wird, wodurch ein nachweisbares Signal erzeugt wird. Ferner ist von Vorteil, daß RNase H die Target-RNA im Hybrid aus RNA-Substratsonde und RNA-Target nicht abbauen kann. Ferner ist die Menge der RNA-Substratsonde nicht kritisch, und sie kann in einem sehr hohen  
25 Überschuß, wie z.B. 500 nM gegenüber 2 nM Ribozym-Target oder 0,066 nM Ribozym, eingesetzt werden.

Gegenüber den auf der PCR-basierenden Echtzeitverfahren wie TaqMan<sup>®</sup> oder Light Cycler<sup>®</sup> weist das erfindungsgemäße Verfahren  
30 unter isothermen wie unter cyclischen Temperaturbedingungen (PCR) ebenfalls Vorteile auf. Aufgrund der Möglichkeit, im Rahmen eines Amplifikationsschrittes mehrere Sonden zu spalten, kann ein vergleichsweise höheres Signal generiert werden. Dieses führt zu einer höheren Sensitivität der Reaktion und zu einer verkürzten  
35 Reaktionszeit. Zudem ist die Signalgenerierung aufgrund der enzymatischen Spaltung grundsätzlich steuerbar. Ein weiterer Vorteil des beschriebenen Verfahrens liegt in der hohen Spezifi-

tät der Reaktion, da nur eine exakte Hybridisierung der Sonde mit der Zielsequenz zum Spaltungsprozeß und damit zum Entstehen eines signifikanten Signals führt. ferner ist insbesondere im Vergleich zum TaqMan<sup>®</sup> keine aufwendige Sondenkonstruktion notwendig, da  
5 sich die Sonde nach jedem Spaltungsprozeß von der Zielsequenz löst. Ein weiterer Vorteil des beschriebenen Verfahrens besteht in der Möglichkeit des Multiplexing

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt aufgrund der enzymatischen  
10 Spaltung der Sonde eine sehr gute und exakte lineare Quantifizierung. Im erfindungsgemäßen Ribozym-System erzeugt die Hybridisierung selbst nur ein sehr schwaches Signal, während jedes in der amplifizierten Nukleinsäure vorhandene Ribozym eine Vielzahl von Nukleinsäure-Substratsonden spaltet. Diese weitere Amplifikation  
15 ist sehr spezifisch und erfordert das Vorliegen einer vollständig hybridisierenden Sequenz (vgl. Singh et al., Antisense and Nucleic Acid Drug Dev. 6 (1996) 165-168). Ohne das Risiko, falsch positive Resultate zu erhalten, können Temperatur und sonstige Reaktionsbedingungen optimiert werden, um zu einem maximalen  
20 Fluoreszenzsignal zu kommen. Beispielsweise können synthetische Peptide (vgl. Müller et al., J. Mol. Biol. 242 (1994) 422-429), CTAB (Nedbal et al., Biochemistry 36 (1997) 13552-7) oder GAP-DH (Sioud et al., J. Mol. Biol. 257 (1996) 775-789) zugesetzt werden, die die Effizienz, wie z.B. die Hybridisierungsgeschwin-  
25 digkeit, und die Spezifität der Target-Erkennung erhöhen können.

Gegenüber den im Stand der Technik angewandten oder vorgeschlagenen Amplifikationsverfahren mit Target-Quantifizierung können durch die vorliegende Erfindung die Stabilität der RNA-Sonde  
30 erhöht und deren Kosten gleichzeitig reduziert werden. So ist es z.B. möglich, nahezu alle, bei der chemischen Synthese teureren Ribonukleotide durch 2'-Desoxyribonukleotide zu ersetzen, die billiger und gegenüber Abbau (durch längerfristige Lagerung, Einwirkung von Nukleasen, Metallionen wie Magnesium, sowie Hitze  
35 usw.; vgl. Bratty et al., Biochim. Biophys. Acta 1216 (1993) 345-359) stabiler sind.

Im Hinblick auf eine Verbesserung der allgemeinen Ribozym-Struktur und Effizienz des Verfahrens sind unter anderem folgende Modifikationen möglich:

- 5 Um die Reaktionsgeschwindigkeit zu erhöhen, d.h. um mehr Signale bezogen auf die Anzahl amplifizierter Nukleinsäure-Moleküle zu erzeugen, sollte auf den Spaltungsort des Ribozyms die Sequenz UA folgen (vgl. Clouet-d'Orval et al., Biochemistry 36 (1997) 9087-9092). Ferner sollte die Position X (vgl. Figur 4B) die  
10 modifizierte Base Pyridin-4-on (vgl. Burgin et al., Biochemistry 35 (1996) 14090-14097) enthalten, was ebenfalls zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit der Detektionsstufe führt.

Durch das Ersetzen der meisten Ribonukleotide durch Desoxy-  
15 ribonukleotide können die Kosten für eine RNA-Sonde um bis das 10fache gesenkt werden. An vier Positionen sind Ribonukleotide jedoch essentiell, die z.B. in Fig. 2B, 4B, 15 und 16 mit "r" gekennzeichnet sind (vgl. Byang et al., Biochemistry 31 (1992) 5005-5009). In den hierin vorhandenen Tabellen werden zur  
20 Unterscheidung von Desoxy- und Ribonukleotiden ferner Großbuchstaben (für dNTPs) und Kleinbuchstaben (für rNTPs) verwendet.

Ferner hat sich gezeigt, daß chimäre DNA/RNA Hammerkopf-Ribozyme eine erhöhte katalytische Effizienz und Stabilität aufweisen  
25 (N.R. Taylor et al., Nucleic Acids Research 20 (1992) 4559-4565). Dieses Prinzip kann man erfindungsgemäß insbesondere für Amplifikationsverfahren wie z.B. PCR ausnutzen, die bei höheren Temperaturen oder bei cyclischen Temperaturprofilen durchgeführt werden.

30 Zusätze wie z.B. das Protein GAP-DH (vgl. Sioud et al., J. Mol. Biol. 257 (1996) 775-789), kurze synthetische Peptide, die vom Viral coat protein (vgl. Müller et al., J. Mol. Biol. 242 (1994) 422-429) abgeleitet sind oder die chemische Substanz CTAB (Netbal  
35 et al., Biochemistry 36 (1997) 13552-13557) sind geeignet, die Effektivität des Verfahrens im Hinblick auf das Auffinden von in großen Nukleinsäure-Strukturen "versteckten" Targets, d.h.

Ribozym-Motiven, zu erhöhen.

Auf Basis der vorliegenden Erfindung ist es erstmals möglich, mehrere verschiedene Targets simultan durch Verwendung entsprechender Ribozym-Sonden mit unterschiedlichen Reporter-Farbstoffen nachzuweisen. Dabei sind Sequenz-spezifische Sonden erforderlich, die selektiv an den jeweils nachzuweisenden Target-Nukleinsäuren anhaften und bei Ribozym-Spaltung Fluoreszenz-Signale unterschiedlicher Wellenlänge erzeugen. Beispielsweise ist es möglich, den Quencher DABCYL mit Reporter-Farbstoffen, wie z.B. Cumarin (Fluoreszenzemission bei 475 nm), FAM (Fluoreszenzemission bei 515 nm), BODIPY (Fluoreszenzemission bei 525 nm), TAMRA (Fluoreszenzemission bei 575 nm), Texas red (615 nm), CY-5 (674 nm) usw., zu kombinieren (vgl. Tyagi et al., Nature Biotech. 16 (1998) 49-53). Mit diesem sogenannten "Multiplexing" ist es somit möglich, innerhalb eines Reaktionsansatzes gleichzeitig eine Target-RNA sowie mehrere Referenzproben bekannter Konzentration, deren Sequenzen sich im Primer-bindenden Abschnitt jeweils geringfügig voneinander unterscheiden, zu amplifizieren, wobei durch Sequenz-spezifische Sonden, die unterschiedliche Reporter/Quencher-Kombinationen tragen, eine Quantifizierung erfolgen kann, ohne daß getrennte Amplifikationen und Fluoreszenzmessungen mit den RNA-Referenzproben durchgeführt werden müssen.

25

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner einen Kit zur Durchführung der oben genannten Verfahren, der entweder

- 30 a) einen Amplifikationsprimer, an den eine Nukleinsäure-Sequenz, vorzugsweise mit einer Länge von 1 bis 40 Nukleotiden, angehängt ist, die für das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (oder 5'-CUGANGA-3') im Transkript kodiert,
- b) einen weiteren Amplifikationsprimer,
- 35 c) Enzyme und Reagenzien zur Durchführung der Amplifikationsreaktion,
- d) eine Nukleinsäure-Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50

Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (oder 5'-GAAA-3') enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls

- 5 e) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel umfaßt,

oder

- 10 a) zwei Amplifikationsprimer,  
b) Enzyme zur Durchführung der Amplifikation,  
c) eine Nukleinsäure-Sonde vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (oder  
15 5'-GAAA-3') enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls  
d) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel

20

umfaßt.

Gemäß einem Teilaspekt der vorliegenden Erfindung werden erstmals ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren sowie Kits zur  
25 Durchführung des Verfahrens zur Verfügung gestellt.

Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) oder das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthalten, bei dem man  
30 eine die Nukleinsäure enthaltende Probe mit einer Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide) in Kontakt bringt, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) oder das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-  
35 Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, wobei die Sonde eine zur Hybridisierung mit der nachzuweisenden Nukleinsäure geeignete Sequenz aufweisen muß und man die Nukleinsäure durch



Erhalt eines der Wahl der Reporter- und Quencher-Moleküle entsprechendes Fluoreszenzsignals nachweist.

Ein erfindungsgemäßer Kit zur Durchführung dieses Nachweisverfahrens umfaßt neben zur Durchführung der Reaktion erforderlichen Lösungsmittel und Reagenzien eine Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) oder das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül (s.o.) angehängt sind, wobei die Sonde eine zur Hybridisierung mit der nachzuweisenden Nukleinsäure geeignete Sequenz aufweist.

Für den Fall, daß die Target-Nukleinsäuren keines der Sequenzmotive A oder B enthalten, kann die Nukleinsäure nachgewiesen werden, indem eines der Motive z.B. durch Nukleinsäureamplifikation unter Verwendung eines oben genannten Primers eingeführt wird. Zur Detektion ist eine entsprechende doppelt fluoreszenzmarkierte Sonde (s.o.) erforderlich, die ein zur Ribozym-Bildung geeignetes Sequenzmotiv enthält.

Mit den erfindungsgemäßen Verfahren und Kits wird - mit oder ohne Einsatz einer Nukleinsäure-Amplifikation - eine neue Methode zum Erreger-Nachweis zur Verfügung gestellt. Wie im folgenden angegeben enthält beispielsweise die 16S rRNA vieler Erreger-Spezies bereits natürlicherweise ein 5'-GAAA-3' Ribozym-Motiv, das zur Bildung des Hammerkopf-Ribozyms ausgenutzt werden kann. Falls die Nukleinsäuren der Erreger keine zur Ausbildung von Ribozymen geeignete Sequenzmotive enthalten können diese, wie oben angegeben, im Rahmen der Amplifikationsstufen durch Verwendung entsprechender Primer eingeführt bzw. "addiert" werden.

Tab. I: GAAA in 16S rRNA

Region in E.coli 16S rRNA	70-100	115-145
E. coli	---	taatgtctggGAAActgcctgatg
Salmonella	---	taatgtctggGAAActgcctgatg
Staphylococcus	---	---
C. perfringens	tttccttcggGAAAcggattagcg	---
Vibrio	aagtcgagcgGAAAcgagttatct	taatgcctagGAAAttgcctgat
B. cereus	---	---
C. botulinum	---	---
Campylobacter	---	---
Yersinia	---	taatgtctggGAAActgcctgatg
Listeria	---	---

Region in E. coli 16S rRNA	145-175	180-210
E. coli	ataactactgGAAAcggtagctaa	---
Salmonella	ataactactgGAAAcggtggctaa	---
Staphylococcus	ataacttcggGAAAcggagctaa	gttcanaagtGAAAgacggcttg
C. perfringens	atagccttccGAAAggaagattaa	tcataatgttGAAAgatggcatca
Vibrio	ataaccattgGAAAcgagtgctaa	---
B. cereus	ataactccggGAAAcgggggctaa	cgcattggttcGAAAttGAAAggcg
C. botulinum	atagccttccGAAAggaagattaa	---
Campylobacter	acaacagttgGAAAcgactgctaa	gttgagtaggGAAAgtttttcggt
Yersinia	ataactactgGAAAcggtagctaa	---
Listeria	ataactccggGAAAcgggggctaa	ccacgcttttGAAAgatggtttcg

Region in E. coli 16S rRNA	370-400	485-515
E. coli	---	---
Salmonella	---	---
Staphylococcus	cgcaatgggcGAAAgcctgacgga	tacctaatacaGAAAgccacggcta
C. perfringens	agggtcattgGAAActgGAAAct	---
Vibrio	---	---
B. cereus	cgcaatggacGAAAgcttgacgga	tacctaaccaGAAAgccacggcta
C. botulinum	cgcaatggggGAAAccttgacgca	---
Campylobacter	cgcaatggggGAAAccttgacgca	---
Yersinia	---	---
Listeria	cgcaatggacGAAAgcttgacgga	tatctaaccaGAAAgccacggcta

Region in E. coli 16S rRNA	595-625	625-655
E. coli	agtcagatgtGAAAtccccgggct	---
Salmonella	agtcggatgtGAAAtccccgggct	aactgcattcGAAActggcaggct
Staphylococcus	agtcctgatgtGAAAgcccacggct	agggtcattgGAAActgGAAAct
C. perfringens	agtgggatgtGAAAtaccgggct	---
Vibrio	agtcagatgtGAAAgcccgggct	nattgcatttGAAActggcagact
B. cereus	agtcctgatgtGAAAgcccacggct	agggtcattgGAAActgggagact
C. botulinum	agtgggatgtGAAAtccccgggct	---
Campylobacter	agtccttctgtGAAAtctaattggct	aactgcttggGAAActgatagtct
Yersinia	cagtcagatgtGAAAtccccggct	aactgcatttGAAActggcaagct
Listeria	agtcctgatgtGAAAgcccgggct	agggtcattgGAAActggaagact

Region in E. coli 16S rRNA	650-680	660-690
E. coli	---	---
Salmonella	---	---
Staphylococcus	ttgGAAActgGAAActtgagtgc	tgcagaagagGAAAggtgaattcc
C. perfringens	---	---
Vibrio	---	---
B. cereus	---	tgcagaagagGAAAggtgaattcc
C. botulinum	---	tgcaggagagGAAAgcgaattcc
Campylobacter	---	---
Yersinia	---	---
Listeria	---	---

Region in E. coli 16S rRNA	685-715	755-780
E. coli	gtgtagcgggtGAAAtgcgtagaga	gctcaggtgcGAAAgcgtggggag
Salmonella	gtgtagcgggtGAAAtgcgtagaga	gctcaggtgcGAAAgcgtggggag
Staphylococcus	gtgtagcgggtGAAAtgcgtagaga	gctgatgtgcGAAAgcgtggggat
C. perfringens	gtgtagcgggtGAAAtgcgtagaga	gctgaggctcGAAAgcgtggggag
Vibrio	gtgtagcgggtGAAAtgcgtagaga	---
B. cereus	gtgtagcgggtGAAAtgcgtagaga	actgaggcgcGAAAgcgtggggag
C. botulinum	gtgtagcgggtGAAAtgcgtagaga	gctgaggcacGAAAgcgtgggtag
Campylobacter	---	gctaaggcgcGAAAgcgtggggag
Yersinia	gtgtagcgggtGAAAtgcgtagaga	gctcaggtgcGAAAgcgtggggag
Listeria	gtgtagcgggtGAAAtgcgtagata	gctgaggcgcGAAAgcgtggggag

Region in E. coli 16S rRNA	895-925	1000-1050
E. coli	---	---
Salmonella	---	---
Staphylococcus	ccgcaagggttGAAActcaaaggaa	---
C. perfringens	---	cttaatcgagGAAAtccttcgggg
Vibrio	---	---
B. cereus	ccgcaagggttGAAActcaaaggaa	---
C. botulinum	---	---
Campylobacter	---	---
Yersinia	---	---
Listeria	ccgcaagggttGAAActcaaaggaa	---

Region in E. coli 16S rRNA	1065-1095	1245-1275
E. coli	ctcgtgttgtGAAAtgttgggtta	---
Salmonella	ctcgtgttgtGAAAtgtcgggtta	---
Staphylococcus	---	aaagggcagcGAAAccgcgaggtc
C. perfringens	---	---
Vibrio	ctcgtgttgtGAAAtgttgggtta	ggcaacttgcGAAAgtagcgaat
B. cereus	---	---
C. botulinum	---	---
Campylobacter	---	---
Yersinia	ctcgtgttgtGAAAtgttgggtta	---
Listeria	---	---

Region in E. coli 16S rRNA	1305-1335
E. coli	---
Salmonella	---
Staphylococcus	---
C. perfringens	attgtaggtGAAActgcctaca
Vibrio	---
B. cereus	---
C. botulinum	---
Campylobacter	---
Yersinia	---
Listeria	---

Tab. II: GAAA in 16S rRNA

Region in E. coli 16S rRNA	70-100	115-145
<i>S. aureus</i>	---	---
<i>S. epidermidis</i>	---	---
<i>S. pneumoniae</i>	---	---
<i>S. pyogenes</i>	---	---
<i>E. faecalis</i>	cactcaattgGAAAgaggagtggc	---
<i>N. meningitidis</i>	---	---
<i>E. coli</i>	---	taatgtctggGAAActgcctgatg
<i>Enterobacter spec.</i>	---	taatgtctggGAAActgccgatgg
<i>Proteus spec.</i>	---	ggtaacaggaGAAAgcttgctttc
<i>P. aeruginosa</i>	---	---
<i>P. fluorescens</i>	---	---
<i>P. mendocina</i>	---	---
<i>P. syringae</i>	---	---
<i>H. influenzae</i>	---	ggtagcaggaGAAAgcttgctttc
<i>H. ducreyi</i>	---	---
<i>Bacteroides spec.</i>	---	---

Region in E. coli 16S rRNA	145-175	180-210
<i>S. aureus</i>	ataacttcggGAAAccggagctaa	gttcnaaagtGAAAgacggtcttg
<i>S. epidermidis</i>	ataacttcggGAAAccggagctaa	gttcaatagtGAAAgacggttttg
<i>S. pneumoniae</i>	ataactattgGAAAcgatagctaa	---
<i>S. pyogenes</i>	ataactattgGAAAcgatagctaa	---
<i>E. faecalis</i>	ataacacttgGAAAcaggtgctaa	gcataagagtGAAAgcgctttcg
<i>N. meningitidis</i>	ataactgatcGAAAgatcagctaa	tcttgagagaGAAAgcaggggacc
<i>E. coli</i>	ataactactgGAAAcggtagctaa	---
<i>Enterobacter spec.</i>	ataactactgGAAAcggtagctaa	---
<i>Proteus spec.</i>	ataactactgGAAAcggtggctaa	---
<i>P. aeruginosa</i>	ataacgtccgGAAAcggccgctaa	tcctgaggggaGAAAgtcggggatc
<i>P. fluorescens</i>	ataacgttcgGAAAcggacgctaa	tcctacgggaGAAAgcaggggacc
<i>P. mendocina</i>	ataacgttccGAAAggaacgctaa	tcctacgggaGAAAgcangggacc
<i>P. syringae</i>	ataacgtccgGAAAcggacgctaa	tcctacgggaGAAAgcaggggacc
<i>H. influenzae</i>	ataactactgGAAAcggtagctaa	taaggggggcGAAAgctgttgcca
<i>H. ducreyi</i>	ataactarggGAAActgtagctaa	---
<i>Bacteroides spec.</i>	atagccctttcGAAAGAAAgattna	---

Region in <i>E. coli</i> 16S rRNA	370-400	450-480
<i>S. aureus</i>	cgcaatgggcGAAAgcctgacgga	---
<i>S. epidermidis</i>	cgcaatgggcGAAAgcctgacgga	---
<i>S. pneumoniae</i>	---	tgtgagagtGAAAgttcacactg
<i>S. pyogenes</i>	---	gggggagtGAAAtccaccaag
<i>E. faecalis</i>	ggcaatgggcGAAAgcttgaccga	---
<i>N. meningitidis</i>	---	tgtcagggaaGAAAggctgttgc
<i>E. coli</i>	---	---
<i>Enterobacter spec.</i>	---	---
<i>Proteus spec.</i>	---	---
<i>P. aeruginosa</i>	---	---
<i>P. fluorescens</i>	gacaatgggcGAAAgcctgatcca	---
<i>P. mendocina</i>	gacaatgggcGAAAgcctnatcca	---
<i>P. syringae</i>	gacaatgggcGAAAgcctgatcca	---
<i>H. influenzae</i>	cgcaatggggGAAAccctgatgca	---
<i>H. ducreyi</i>	cacaatggggGAAAccctgatgca	---
<i>Bacteroides spec.</i>	---	---

Region in <i>E. coli</i> 16S rRNA	485-515	595-625
<i>S. aureus</i>	tacctaatacaGAAAgccacggcta	agtctgatgtGAAAgcccacggct
<i>S. epidermidis</i>	tacctaatacaGAAAgccacggcta	agtctgatgtGAAAgcccacggct
<i>S. pneumoniae</i>	tatcttaccGAAAgggacggcta	---
<i>S. pyogenes</i>	taactaaccaGAAAgggacggcta	---
<i>E. faecalis</i>	tatctaaccaGAAAgccacggcta	agtctgatgtGAAAgccccggct
<i>N. meningitidis</i>	---	agcaggatgtGAAAtccccgggct
<i>E. coli</i>	---	agtcagatgtGAAAtccccgggct
<i>Enterobacter spec.</i>	---	aagtcgatgtGAAAtccccgggct
<i>Proteus spec.</i>	---	agtcagatgtGAAAgccccgagct
<i>P. aeruginosa</i>	---	agcttgatgtGAAAtccccgggct
<i>P. fluorescens</i>	---	agttggatgtGAAAtccccgggct
<i>P. mendocina</i>	---	agttggatgtGAAAgccccgggct
<i>P. syringae</i>	---	agttgaatgtGAAAtccccgggct
<i>H. influenzae</i>	---	agtggagtgtGAAAgccctgggct
<i>H. ducreyi</i>	---	agtggagtgtGAAAgccccgggct
<i>Bacteroides spec.</i>	---	agtcagttgtGAAAgtttgaggct

Region in E. coli 16S rRNA	625-655	650-680
<i>S. aureus</i>	agggtcattgGAAActgGAAAact	ttgGAAActgGAAAacttgagtgc
<i>S. epidermidis</i>	agggtcattgGAAActgGAAAact	ttgGAAActgGAAAacttgagtgc
<i>S. pneumoniae</i>	gtaggetttgGAAActggttaact	---
<i>S. pyogenes</i>	gtacgctttgGAAActggagaact	---
<i>E. faecalis</i>	agggtcattgGAAActgggagact	---
<i>N. meningitidis</i>	---	---
<i>E. coli</i>	---	---
<i>Enterobacter spec.</i>	aactgcattgGAAActggcagctt	---
<i>Proteus spec.</i>	aactgcattgGAAActggcagctt	---
<i>P. aeruginosa</i>	---	---
<i>P. fluorescens</i>	---	---
<i>P. mendocina</i>	---	---
<i>P. syringae</i>	---	---
<i>H. influenzae</i>	---	---
<i>H. ducreyi</i>	---	---
<i>Bacteroides spec.</i>	aattgcagtrGAAActggcagctt	---

Region in E. coli 16S rRNA	660-690	685-715
<i>S. aureus</i>	tgcagaagagGAAAggtggaattcc	gtgtagcgggGAAAtgcgcagaga
<i>S. epidermidis</i>	tgcagaagagGAAAggtggaattcc	gtgtagcgggGAAAtgcgcagaga
<i>S. pneumoniae</i>	---	gtgtagcgggGAAAtgcgtagata
<i>S. pyogenes</i>	---	gtgtagcgggGAAAtgcgtagata
<i>E. faecalis</i>	---	gtgtagcgggGAAAtgcgtagata
<i>N. meningitidis</i>	---	gtgtagcaggGAAAtgcgtagaga
<i>E. coli</i>	---	gtgtagcgggGAAAtgcgtagaga
<i>Enterobacter spec.</i>	---	gtgtagcgggGAAAtgcgtagaga
<i>Proteus spec.</i>	---	gtgtagcgggGAAAtgcgtagaga
<i>P. aeruginosa</i>	---	gtgtagcgggGAAAtgcgtagata
<i>P. fluorescens</i>	---	gtgtagygggGAAAtgcgtagata
<i>P. mendocina</i>	---	gtgtagcgggGAAAtgcgtagata
<i>P. syringae</i>	---	gtgtagcgggGAAAtgcgtagata
<i>H. influenzae</i>	---	gtgtagcgggGAAAtgcgtagaga
<i>H. ducreyi</i>	---	gtgtagcgggGAAAtgcgtagaga
<i>Bacteroides spec.</i>	---	gtgtagcgggGAAAtgcgtagata

Region in E. coli 16S rRNA	715-745	755-780
<i>S. aureus</i>	---	gctgatgtgcGAAAgcgtggggat
<i>S. epidermidis</i>	---	gctgatgtgcGAAAgcgtggggat
<i>S. pneumoniae</i>	caccggtggcGAAAgcggctctct	gctgaggctcGAAAgcgtggggag
<i>S. pyogenes</i>	caccggtggcGAAAgcggctctct	gctgaggctcGAAAgcgtggggag
<i>E. faecalis</i>	---	gctgaggctcGAAAgcgtggggag
<i>N. meningitidis</i>	---	gttcatgcccGAAAgcgtgggtag
<i>E. coli</i>	---	gctcaggtgcGAAAgcgtggggag
<i>Enterobacter spec.</i>	---	gctcaggtgcGAAAgcgtggggag
<i>Proteus spec.</i>	---	gctcaggtgcGAAAgcgtggggag
<i>P. aeruginosa</i>	---	actgaggtgcGAAAgcgtggggag
<i>P. fluorescens</i>	---	actgaggtgcGAAAgcgtggggag
<i>P. mendocina</i>	---	actgaggtgcGAAAgcgtggggag
<i>P. syringae</i>	---	actgaggtgcGAAAgcgtggggag
<i>H. influenzae</i>	---	gctcatgtgtGAAAgcgtggggag
<i>H. ducreyi</i>	---	gctcatgtgcGAAAgcgtggggag
<i>Bacteroides spec.</i>	---	actgatgctcGAAAgtgtgggtat

Region in E. coli 16S rRNA	845-875	895-925
<i>S. aureus</i>	---	ccgcaagggtGAAActcaaaggaa
<i>S. epidermidis</i>	---	ccgcaagggtGAAActcaaaggaa
<i>S. pneumoniae</i>	---	ccgcaagggtGAAActcaaaggaa
<i>S. pyogenes</i>	---	ccgcaagggtGAAActcaaaggaa
<i>E. faecalis</i>	---	ccgcaagggtGAAActcaaaggaa
<i>N. meningitidis</i>	gctaacgcgtGAAAttgaccgcct	---
<i>E. coli</i>	---	---
<i>Enterobacter spec.</i>	---	---
<i>Proteus spec.</i>	---	---
<i>P. aeruginosa</i>	---	---
<i>P. fluorescens</i>	---	---
<i>P. mendocina</i>	---	---
<i>P. syringae</i>	---	---
<i>H. influenzae</i>	---	---
<i>H. ducreyi</i>	---	---
<i>Bacteroides spec.</i>	---	ccgcaacgggtGAAActcaaaggaa



Region in E. coli 16S rRNA	1065-1095	1245-1275
S. aureus	---	aaagggcagcGAAAccgcgaggtc
S. epidermidis	---	aaagggtagcGAAAccgcgaggtc
S. pneumoniae	---	---
S. pyogenes	---	---
E. faecalis	---	---
N. meningitidis	---	---
E. coli	ctcgtgttgtGAAAtgttgggtta	---
Enterobacter spec.	ctcgtgttgtGAAAtgttgggtta	---
Proteus spec.	tcgttgttgtGAAAtgttgggtta	---
P.aeruginosa	---	---
P. fluorescens	---	---
P. mendocina	---	---
P. syringae	---	---
H. influenzae	ctcgtgttgtGAAAtgttgggttn	gcgaatctcaGAAAgtcacatctaa
H.ducreyi	ctcgtgttgtGAAAtgttgggttn	---
Bacteroides spec.	---	---

Region in E. coli 16S rRNA	1400-1430
S. aureus	---
S. epidermidis	---
S. pneumoniae	---
S. pyogenes	---
E. faecalis	---
N. meningitidis	---
E. coli	---
Enterobacter spec.	---
Proteus spec.	---
P.aeruginosa	---
P. fluorescens	---
P. mendocina	---
P. syringae	---
H. influenzae	---
H.ducreyi	---
Bacteroides spec.	gaataacgtgGAAAcattgttagcc

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen und Figuren näher erläutert.

Beschreibung der Figuren:

5

Fig. 1: Allgemeines Schema der NASBA<sup>®</sup> kombiniert mit Ribozymen zur Echtzeitdetektion.

Ribozym-Motiv innerhalb eines der zwei Primer. Es ist nur eine Möglichkeit gezeigt, bei der sich das Ribozym-Motiv am 3'-Ende  
10 der amplifizierten RNA befindet. Die RNA Substrat-Sonde ist mit einem Fluorezenzfarbstoffen markiert, dem Reporter (Kreis) und einem Quencher (Dreieck). In der intakten Sonde führt die effiziente Wechselwirkung beider Labels zum "FRET" or Quenching, d.h. zu keinem (or nur sehr schwachem) Reporter-Signal (leerer  
15 Kreis). Das Ribozym spaltet viele Sonden-Moleküle. In der gespaltenen Sonde werden beide Labels getrennt, und es wird ein starkes Reporter-Signal erzeugt (gefüllte Kreise).

Fig. 2: A: Allgemeine Struktur von Hammerkopf-Ribozymen. Es sind  
20 nur konservierte Nukleotide mit entsprechenden Buchstaben bezeichnet, alle nicht-konservierten Positionen sind mit N angegeben. Die Länge der hybridisierenden Arme können den jeweiligen Erfordernissen angepaßt werden. Drei Orte möglicher Hairpin-Schleifen sind durch gepunktete Linien dargestellt. Die  
25 Polarität (5'-3' Richtung) ist nur für den gespaltenen Abschnitt angegeben. B: Entspricht Fig. 2A, wobei die Positionen, an denen vorzugsweise Ribonukleotide eingesetzt werden mit dem Präfix "r" versehen sind, die übrigen Nukleotide können jeweils entweder Ribo- oder Desoxyribonukleotide sein.

30

Fig. 3: Eine Möglichkeit zur Aufspaltung eines minimalen Ribozyms und einer Nukleinsäure-Substrat-Sonde. Das konservierte Ribozym-Motiv wurde auf GAAA verkürzt.

35

Fig. 4: A: Basierend auf der in Fig. 3 dargestellten Möglichkeit ist eine amplifizierte Nukleinsäure (dicke Linie) mit dem minimalen Ribozym-Motiv gezeigt. Die Nukleinsäure Substrat-Sonde enthält Reporter und Quencher (einige wenige Möglichkeiten sind unten angegeben) an beiden Enden, sie können aber auch mit anderen Positionen verknüpft werden. B: Entspricht Fig. 4A, wobei die Positionen, an denen vorzugsweise Ribonukleotide eingesetzt werden mit dem Präfix "r" versehen sind, die übrigen Nukleotide können jeweils entweder Ribo- oder Desoxyribonukleotide sein.

10

Fig. 5: Eine weitere Möglichkeit zur Aufspaltung einer Nukleinsäure-Substrat-Sonde. Das konservierte Ribozym-Motiv ist auf CUGA-N-GA reduziert.

15 Fig. 6: Basierend auf der in Fig. 5 dargestellten Möglichkeit ist eine amplifizierte Nukleinsäure (dicke Linie) mit dem minimalen Ribozym-Motiv gezeigt. Die Nukleinsäure Substrat-Sonde enthält Reporter und Quencher an beiden Enden, sie können aber auch mit anderen Positionen verknüpft werden (vgl. Fig. 4).

20

Fig. 7: Basierend auf der in Fig. 3 dargestellten Möglichkeit enthält der reverse Primer das Ribozym-Motiv. Oben ist das Hybrid zwischen primärer Target-Nukleinsäure und Primer gezeigt. Die Position innerhalb der Target-Nukleinsäure und die Länge des Basenpaar-bildenden Streches kann variieren. Die resultierende amplifizierte Nukleinsäure mit dem vollständigen Ribozym-Motiv ist unten gezeigt.

25

Fig. 8: Basierend auf der in Fig. 3 dargestellten Möglichkeit enthält der reverse Primer das Ribozym-Motiv in einer Ausbuchtung. Oben ist das Hybrid zwischen primärer Target-Nukleinsäure und Primer gezeigt. Die Position innerhalb der Target-Nukleinsäure und die Länge beider Basenpaar-bildenden Streches kann variieren. Die resultierende amplifizierte Nukleinsäure mit dem vollständigen Ribozym-Motiv ist unten gezeigt.

30

35

Fig. 9: Basierend auf der in Fig. 3 dargestellten Möglichkeit enthält der reverse Primer das Ribozym-Motiv in einer Ausbuchtung, gefolgt von einem sehr kurzen 3'-terminalen basengepaarten Abschnitt. Wie gezeigt ist, kann dieser Abschnitt mit dem Ribozym-Motiv überlappen, und die Ausbuchtung kann so kurz sein, daß sie nur ein Nukleotid umfaßt. Oben ist das Hybrid zwischen primärer Target-Nukleinsäure und Primer gezeigt. Die Position innerhalb der Target-Nukleinsäure und die Länge beider Basenpaarbildenden Streches kann variieren. Die resultierende amplifizierte Nukleinsäure mit dem vollständigen Ribozym-Motiv ist unten gezeigt.

Fig. 10: Basierend auf der in Fig. 2B dargestellten Möglichkeit enthält der reverse Primer das Ribozym-Motiv in einer Ausbuchtung gefolgt von einer einzigen rA-T Basenpaarung mit der Target-Sequenz. Oben ist das Hybrid zwischen primärer Target-Nukleinsäure und Primer gezeigt. Die Position innerhalb der Target-Nukleinsäure und die Länge beider Basenpaarbildenden Streches kann variieren. Die resultierende amplifizierte Nukleinsäure mit dem vollständigen Ribozym-Motiv ist unten gezeigt.

Fig. 11: Entspricht der in Fig. 10 dargestellten Möglichkeit. Hier enthält die Target-Sequenz jedoch bereits einen längeren Stretch des Ribozym-Motivs (oder, wie gezeigt, des vollständigen Motivs).

Fig. 12: Beispielhafte Struktur eines DNAzyms (= katalytische DNA). Das Substrat kann entweder vollständig RNA sein, oder es muß ein Minimum an rA vorhanden sein.

Fig. 13: Beispielhafte Struktur eines weiteren DNAzyms. Das Substrat kann entweder vollständig RNA sein, oder es muß ein Minimum an rRrY vorhanden sein.

Fig. 14: Entspricht Fig. 10, wobei der Primer den überwiegenden Teil des NAzym-Motivs (des katalytischen Nukleinsäure-Motivs) enthält und nur die zwei letzten Nukleotide fehlen. Gezeigt ist hier eine Möglichkeit basierend auf "Prototyp A". Für "Prototyp B" ermöglicht das Vorliegen längerer Motive (z.B. TCGTTG statt TCGT) ein deletierteres Motiv im Primer einzusetzen, wobei das 3'-terminale ACGA im elongierten Primer durch die Target-Sequenz geliefert wird.

10 Fig. 15: Beispiel für eine universelle Ribozym-Sonde.

Fig. 16: Beispiel für eine HIV Ribozym-Sonde.

15

### BEISPIELE

20 Material:

Die im Rahmen der Erfindung eingesetzten Primer und Sonden sind auf dem Fachmann geläufigem Wege erhältlich, wie z.B. durch Oligonukleotidsynthese.

25

### Beispiel 1

NASBA<sup>®</sup>-Reaktion in Kombination mit Ribozym-abhängiger Detektion:

30

Alle Enzyme waren kommerziell von Pharmacia erhältlich, ausgenommen AMV-Reverse Transkriptase, die von Seikagaku bezogen wurde.

35 23µl NASBA<sup>®</sup> Reaktionsmischung, davon 5 µl aus der Aufreinigung nach Boom et al. (J. Clin. Microbiol. 28 (1990) 495-503) (finale

Konzentration in 25 µl Reaktionsmischung: 40 mM Tris, pH 8,5, 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 42 mM KCl, 15 % v/v DMSO, 1 mM jedes dNTP, 2 mM jedes NTP, 0,2 µM Primer 1, 0,2 µM Primer 2 und 0,1-0,5 µM Substrat-Sonde) wurden bei 65 °C für 5 Minuten inkubiert um eine Destabilisation der Sekundärstrukturen in der RNA zu ermöglichen. Anschließend wurde für das Primer-Annealing auf 41 °C abgekühlt. Die Amplifikation wurde durch Zugabe von 2 µl Enzym-Mischung (0,1 µg/µl BSA, 0,1 Einheiten RNase H, 40 Einheiten T7 RNA Polymerase und 8 Einheiten AMV Reverse Transkriptase) gestartet. Die Reaktion wurde bei 41 °C für 90 Minuten inkubiert. Während der Reaktion wurden die Fluoreszenzsignale im ABI Prism 7700 Sequence Detector gemessen. Als Reporter/Quencher wurde die Kombination FAM/TAMRA eingesetzt.

#### 15 Experiment A:

(dNTP = Großbuchstaben; rNTP = Kleinbuchstaben)

20 Primer 1: 5'-AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GTG CTA TGT CAC  
TTC CCC TTG GTT CTC TCA-3'

Primer 2: 5'-GAA TCT CAT CAG TAG CGA GTG GGG GGA CAT CAA GCA  
GCC ATG CAA A-3'

25 Substrat A: 5'-TAMRA-Tga auc gaa acg cga aag cgu cua gcg u-  
FAM-3'

#### Experiment B:

30 Primer 1: 5'-AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GTG CTA TGT CAC  
TTC CCC TTG GTT CTC TCA-3'

Primer 2: 5'-ACG TAG TTT CGG CCT TTC GGC CTC ATC AGC GTG CAG  
TGG GGG GAC ATC AAG CAG CCA TGC AAA-3'

35

Substrat B: 5'-TAMRA-Tac gua guc cgu gcu-FAM-3'

Quantifizierung:

Zur quantitativen Bestimmung der HIV-RNA wurden 4 externe  
5 Kontrollen und 2 unbekannte Proben sowie 2 negative Kontrollen,  
in die oben beschriebene Amplifikation eingesetzt. Mittels der  
Standards wurde eine Eichkurve erstellt, die Konzentration der  
Standards betrug:

- 10 Q1 ca. 1 000 000 Moleküle (RNA)  
Q2 ca. 100 000 Moleküle (RNA)  
Q3 ca. 10 000 Moleküle (RNA)  
Q4 ca. 1 000 Moleküle (RNA)

15 Die Experimente A und B führten zu folgendem Ergebnis: Die im ABI  
PRISM 7700 gemessene Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs FAM, nahm  
entsprechend der eingesetzten Menge an Target-Molekül (RNA) zu.  
Es zeigte sich, daß nach  $t = 15$  Minuten bei der höchsten  
eingesetzten Standard-Molekül-Menge der Schwellenwert für ein  
20 definiert positives Signal erreicht wurde ( $5 \times \text{Std.dev. des}$   
Backgrounds). Die weiteren Standards erreichten nach  $t = 20, 24$   
und 26 Minuten den entsprechenden Schwellenwert. Die unbekannten  
Proben erreichten nach ca.  $t = 18$  und  $t = 23$  Minuten ihren  
Schwellenwert. Anhand der mittels der Standards erstellten  
25 Eichkurve ergab sich für die unbekannten Proben eine Molekülmenge  
von ca. 200 000 ( $t = 18$ ) bzw. 15 000 ( $t = 23$ ). Die Negativkon-  
trollen erreichten den Schwellenwert nicht. Dies zeigt, daß eine  
Quantifizierung von Targetmolekülen durch die hier beschriebene  
Technik möglich ist.

30

Beispiel 2

Universelle Erkennung beliebiger (full-size) amplifizierter RNA-  
35 Targets (ribozyme motive in reverse primer). Die entsprechende  
"Universelle Ribozym-Sonde" wurde dem NASBA<sup>®</sup>-Amplifikationskit

zugesetzt.

An seinem 3'-Ende enthält der reverse Primer die übliche Target-specifiche Sequenz (N) und zusätzlich an seinem 5'-Ende eine Sequenz, die für das allgemeine universelle Ribozym-Motiv codiert:  
5'-GCG TTT CGA TTC CNN NNN N...

Das Transcript endet mit der Sequenz  
5'-...N NNN NNG GAA UCG AAA CGC

10

Die Ribozym-Sonde wies folgende Sequenz auf:

5'-GCG UC - U AGC GGA AAC GCU ACU GAX GAG AUU CC (32-mer)  
- Spaltungsort

15 Zwei Farbstoffe, 5'-Q and 3'-R (oder 3'-Q und 5'-R) waren mit den Enden verknüpft.

Zur quantitativen Bestimmung der HIV-RNA wurden 4 externe Kontrollen und 2 unbekannte Proben sowie 2 negative Kontrollen,  
20 in die oben beschriebene Amplifikation eingesetzt. Mittels der Standards wurde eine Eichkurve erstellt, die Konzentration der Standards betrug:

Q1	ca.	1 000 000	Moleküle (RNA)
25 Q2	ca.	100 000	Moleküle (RNA)
Q3	ca.	10 000	Moleküle (RNA)
Q4	ca.	1 000	Moleküle (RNA)

Das Experiment in Beispiel 2 führte zu folgendem Ergebnis: Die  
30 im ABI PRISM 7700 gemessene Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs FAM, nahm entsprechend der eingesetzten Menge an Target-Molekül (RNA) zu. Es zeigte sich, daß nach t = 12 Minuten bei der höchsten eingesetzten Standard-Molekül-Menge der Schwellenwert für ein definiert positives Signal erreicht wurde (5 × Std.dev.  
35 des Backgrounds). Die weiteren Standards erreichten nach t = 18, 22 und 25 Minuten den entsprechenden Schwellenwert. Die unbekann-



ten Proben erreichten nach ca.  $t = 18$  und  $t = 23$  Minuten ihren Schwellenwert. Anhand der mittels der Standards erstellten Eichkurve ergab sich für die unbekannten Proben eine Molekülmenge von ca. 100 000 ( $t = 18$ ) bzw. 8000 ( $t = 23$ ). Die Negativkontrollen erreichten den Schwellenwert nicht. Dies zeigt, daß eine Quantifizierung von Targetmolekülen durch die hier beschriebene Technik möglich ist.

Diese Beispiel-Sonde kann an einem oder beiden Enden durch mehr Basen-gepaarte Nukleotide verlängert sein.

### Beispiel 3

Spezifische Erkennung einer amplifizierten Target Sequenz: proximal zu einem der Primer.

Das vorliegende spezifische Beispiele anhand einer NASBA<sup>®</sup>-gestützten Detektion von HIV (entspr. USP 5,837,501) durchgeführt.

Amplifiziertes Segment der HIV-RNA:

agtggggggacatcaagcagctatgaaa(c,t)gttaaaagatactatcaatgaggaagc-  
tgcagaatgggacagggtacatccagtacatgcagggcctattccaccaggccagatgaga-  
gaaccaaggggaagtacatagca

(es ist nur ein Strang gezeigt, die Primer-Sequenzen sind unterstrichen). Die proximale Sequenz ist ebenfalls hoch konserviert und schließt den folgenden Abschnitt ein:

agcagctatgGaaa(c,t)gttaaaaga

Der Vorwärtsprimer zur Einführung der T7 Promotor-Sequenz (Großbuchstaben) and 1 Punktmutation (fettgedruckter Großbuchstabe):

AATTCTAATACGACTCACTATAGGGagtggggggacatcaagcagctatgGaaa

Das Transkriptionsprodukt enthält das GAAA Ribozym-Motiv, das mit der proximalen HIV-spezifischen Sequenz verknüpft ist:

GGGagcagctatgGaaa(c,t) gttaaaaga....

- 5 Es kann insbesondere mit der komplementären Ribozym-Sonde, entsprechend dem allgemeinen Versuchsprotokoll durchgeführt werden.

- 10 Zur quantitativen Bestimmung der HIV-RNA wurden 4 externe Kontrollen und 2 unbekannte Proben sowie 2 negative Kontrollen, in die oben beschriebene Amplifikation eingesetzt. Mittels der Standards wurde eine Eichkurve erstellt, die Konzentration der Standards betrug:

- 15 Q1 ca. 1 000 000 Moleküle (RNA)  
Q2 ca. 100 000 Moleküle (RNA)  
Q3 ca. 10 000 Moleküle (RNA)  
Q4 ca. 1 000 Moleküle (RNA)

- 20 Das Experiment in Beispiel 3 führte zu folgendem Ergebnis: Die im ABI PRISM 7700 gemessene Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs FAM, nahm entsprechend der eingesetzten Menge an Target-Molekül (RNA) zu. Es zeigte sich, daß nach t = 22 Minuten bei der höchsten eingesetzten Standard-Molekül-Menge der Schwellenwert  
25 für ein definiert positives Signal erreicht wurde (5 × Std.dev. des Backgrounds). Die weiteren Standards erreichten nach t = 24, 28 und 33 Minuten den entsprechenden Schwellenwert. Die unbekannten Proben erreichten nach ca. t = 18 und t = 23 Minuten ihren Schwellenwert. Anhand der mittels der Standards erstellten  
30 Eichkurve ergab sich für die unbekannten Proben eine Molekülmenge von ca. 400 000 (t = 23) bzw. 10 000 (t = 28). Die Negativkontrollen erreichten den Schwellenwert nicht. Dies zeigt, daß eine Quantifizierung von Targetmolekülen durch die hier beschriebene Technik möglich ist.

Beispiel 4

A. GAAA in rRNA-Abschnitten zur spezifischen Detektion von Bakterien-Spezies.

5

In den obigen Tabellen sind die wichtigsten, durch Lebensmittel übertragene Pathogene aufgeführt.

Einzigartige Sequenzmotive (schattiert) liegen zwischen den Positionen 110 and 700 (gemäß E. coli Numerierungssystem) vor. Hoch-konservierte Primer zur 16S rRNA-Amplifikation sind bekannt: 110f and 700r [Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics, E. Stackebrandt and M. Goodfellow, eds. (New York: Willey), pp. 115-175].

15

B. Spezifischen Detektion von Sepsis-Erregern.

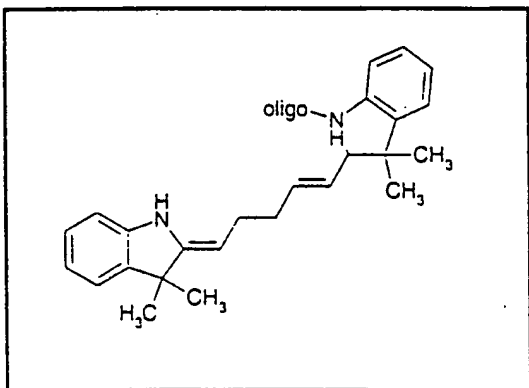
In den obigen Tabellen sind ferner die wichtigsten Sepsis-Erreger aufgeführt.

Einzigartige Sequenzmotive (schattiert), die erfindungsgemäß ausgenutzt werden können liegen zwischen den Positionen 110 and 530 (gemäß E. coli Numerierungssystem) vor. Hoch-konservierte Primer zur 16S rRNA-Amplifikation sind bekannt: [Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics, E. Stackebrandt and M. Goodfellow, eds. (New York: Willey), pp. 115-175].

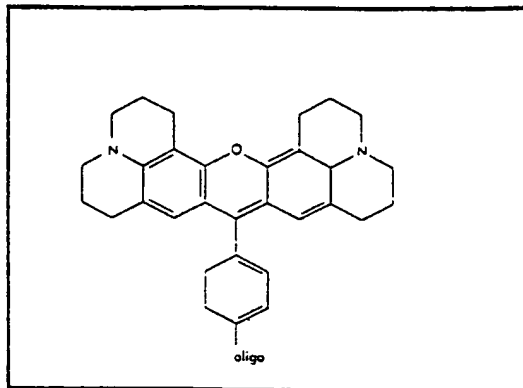
Die in der 16S rRNA enthaltenen Sequenzmotive können für die erfindungsgemäßen Verfahren ausgenutzt werden, so daß im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Verfahren zum Nachweis von Erregern, insbesondere von Sepsis-Erregern und Lebensmittelkeimen, und dafür vorgesehene Kits zur Verfügung gestellt werden.

35

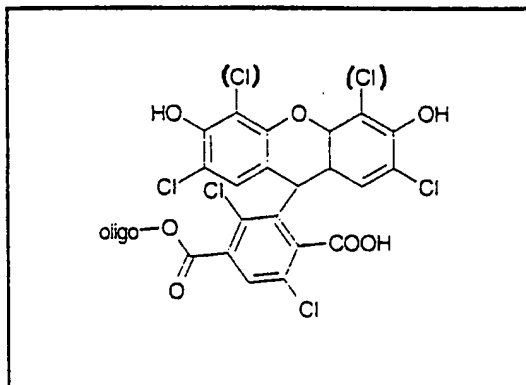
Tab. III: Als Reporter/Quencher geeignete Farbstoffe



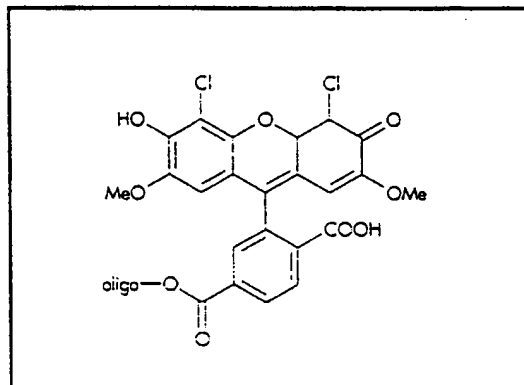
CY5

 $\lambda_{\max,A}: 651 \text{ nm}$   $\lambda_{\max,E}: 674 \text{ nm}$ 

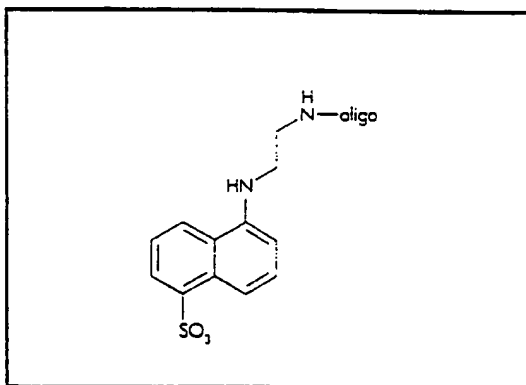
Texas Red

 $\lambda_{\max,A}: 583 \text{ nm}$   $\lambda_{\max,E}: 603 \text{ nm}$ 

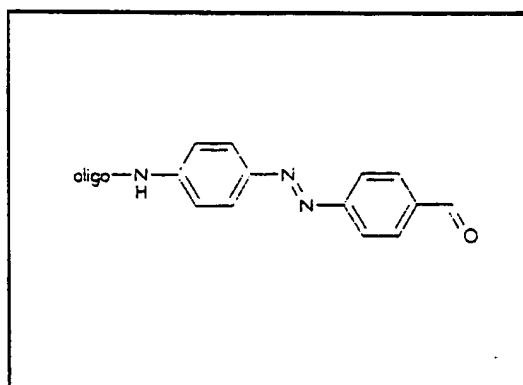
[Cl<sub>6</sub>]: HEX  $\lambda_{\max,A}: 535 \text{ nm}$   $\lambda_{\max,E}: 556 \text{ nm}$   
 [Cl<sub>4</sub>]: TET  $\lambda_{\max,A}: 521 \text{ nm}$   $\lambda_{\max,E}: 536 \text{ nm}$



JOE

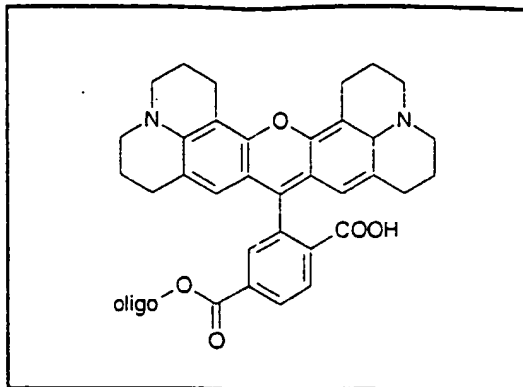
 $\lambda_{\max,A}: 527 \text{ nm}$   $\lambda_{\max,E}: 548 \text{ nm}$ 

edans

 $\lambda_{\max,A}: 336 \text{ nm}$   $\lambda_{\max,E}: 490 \text{ nm}$ 

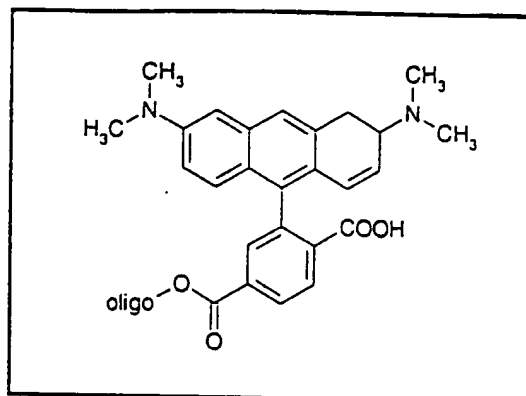
dabcyI

 $\lambda_{\max,A}: 453 \text{ nm}$



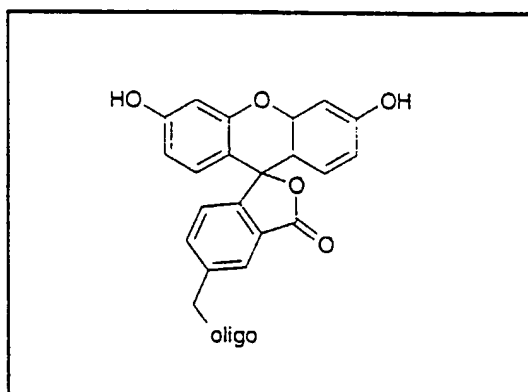
ROX (6-ROX)

ROX:  $\lambda_{\max,A}$ : 568 nm  $\lambda_{\max,E}$ : 595 nm  
 6-ROX:  $\lambda_{\max,A}$ : 575 nm  $\lambda_{\max,E}$ : 602 nm



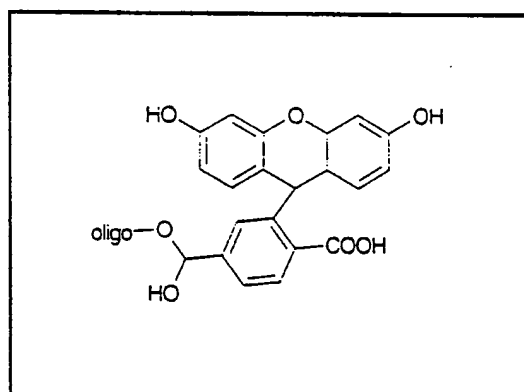
TAMRA

$\lambda_{\max,A}$ : 555 nm  $\lambda_{\max,E}$ : 580 nm



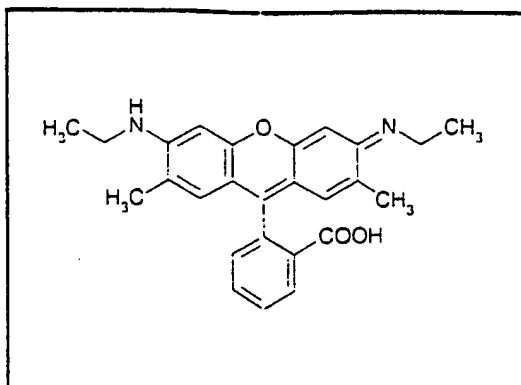
Fluorescein

$\lambda_{\max,A}$ : 494 nm  $\lambda_{\max,E}$ : 525 nm



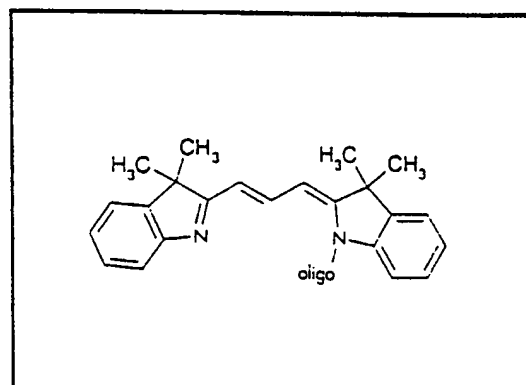
6 - FAM

$\lambda_{\max,A}$ : 492 nm  $\lambda_{\max,E}$ : 515 nm



rhodamine 6G

$\lambda_{\max,A}$ : 518 nm  $\lambda_{\max,E}$ : 543 nm

CY<sub>3</sub>

$\lambda_{\max,A}$ : 552 nm  $\lambda_{\max,E}$ : 565 nm

Tab. III (2. Fortsetzung)

A (nm)	E (nm)	Farbstoffe
349 336	448 490	AMCA ADANS
495 505 494 496	503 513 515 516	BODIPY 493/503 BODIPY LF 6-FAM, Fluorescein 6-OREGON Green 488
521 518 531 528 527	536 543 545 547 548	TET Rhodamin 6G (6-R6G) BODIPY FL Br2 BODIPY R6G 6-JOE
535 535	552 555	BODIPY 530/550 HEX
552 559	565 569	Cy3 BODIPY 558/568
542 546 560	574 579 580	BODIPY TMR 542/574 5-TAMRA NED
575 583 588	602 603 616	6-ROX TEXAS Red BODIPY TR 589/617
630 625 646 651	640 640 660 674	Light Cyclor RED 640 BODIPY 630/650 BODIPY 650/665 Cy5
700 678 685 685 743 787	710 703 705 705 767 807	Light Cyclor Red Cy 5.5 IRD 700 La Jolla Blue Cy 7 IRD 41

A = Absorption

E = Emission

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man
  - a) einen Primer verwendet, an den eine Nukleinsäure-Sequenz, vorzugsweise mit einer Länge von 1 bis 40 Nukleotiden, angehängt ist, der für das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) im Transkript kodiert, wobei man
  - b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses, vorzugsweise in einer Konzentration von 50 bis 500 nM, einer Nukleinsäure-Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man
  - c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration » $c_{rel.}$ « nach folgender Formel bestimmt:

$$c_{rel.} = t_p / t_{Ref.},$$

wobei

$t_p$  der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

$t_{Ref.}$  der für eine Referenz-Nukleinsäure bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Errei-

chen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

2. Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) einen Primer verwendet, an den eine Nukleinsäure-Sequenz, vorzugsweise mit einer Länge von 1 bis 40 Nukleotiden, angehängt ist, der für das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) im Transkript kodiert, wobei man
- b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses, vorzugsweise in einer Konzentration von 50 bis 500 nM, einer Nukleinsäure-Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man
- c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration » $c_{rel.}$ « nach folgender Formel bestimmt:

$$c_{rel.} = t_p / t_{Ref.}$$

wobei

$t_p$  der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

$t_{Ref.}$  der für eine Referenz-Nukleinsäure bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Errei-



chen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

3. Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion einer das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthaltenden Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß man
- a) die Sequenzen der verwendeten Primer so wählt, daß der Sequenzbereich der Nukleinsäure, der Motiv A enthält, amplifiziert wird, wobei man
  - b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses einer Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man
  - c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration » $c_{rel.}$ « nach folgender Formel bestimmt:

$$c_{rel.} = t_p / t_{Ref.}$$

wobei

$t_p$  der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

$t_{Ref.}$  der für eine Referenz-RNA bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

4. Verfahren zur Amplifikation und zum quantitativen Nachweis einer das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthaltenden Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) die Sequenzen der verwendeten Primer so wählt, daß der Sequenzbereich der Nukleinsäure, der Motiv B enthält, amplifiziert wird, wobei man
- b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses einer Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man
- c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration »C<sub>rel.</sub>« nach folgender Formel bestimmt:

$$C_{rel.} = t_p / t_{Ref.},$$

wobei

t<sub>p</sub> der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

t<sub>Ref.</sub> der für eine Referenz-RNA bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure RNA, DNA oder ein DNA/RNA-Chimär ist.

6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die an den Primer angehängte Nukleinsäure-Sequenz eine Länge von 1 bis 40 Nukleotiden aufweist.
7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man die Nukleinsäure-Sonde in einer Konzentration von 50 bis 500 nM einsetzt.
8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure-Sonde eine Länge von 25 bis 60 Nukleotiden, vorzugsweise etwa 50 Nukleotide, hat.
9. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikationsverfahren eine isothermes oder cyclisches Amplifikationsverfahren ist.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikationsverfahren aus der Gruppe bestehend aus NASBA<sup>®</sup>, TMA, 3SR, oder PCR ausgewählt ist.
11. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man als Reporter einen Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus FAM, HEX, TET, ALEXA, Texas Red, Light Cycler Red, IRD 700, CY-7, IRD 41 oder La Jolla Blue und als Quencher einen Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus TAMRA, CY-5, DABCYL, und LCR verwendet.
12. Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthalten, dadurch gekennzeichnet, daß man eine die Nukleinsäure enthaltende Probe mit einer Sonde in Kontakt bringt, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, wobei die Sonde eine zur Hybridisierung mit der nachzuweisenden Nukleinsäure geeignete Sequenz aufweist.

13. Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthalten, bei dem man eine die Nukleinsäure enthaltende Probe mit einer Sonde in Kontakt bringt, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, wobei die Sonde eine zur Hybridisierung mit der nachzuweisenden Nukleinsäure geeignete Sequenz aufweist.
14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure RNA, DNA oder ein DNA/RNA-Chimär ist.
15. Verfahren nach den Ansprüchen 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die an den Primer angehängte Nukleinsäure-Sequenz eine Länge von 1 bis 40 Nukleotiden aufweist.
16. Verfahren nach den Ansprüchen 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure-Sonde eine Länge von 25 bis 60 Nukleotiden, vorzugsweise etwa 50 Nukleotide, hat.
17. Verfahren nach den Ansprüchen 12 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß man als Reporter einen Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus FAM, HEX, TET, ALEXA, Texas Red, Light Cycler Red, IRD 700, CY-7, IRD 41 oder La Jolla Blue und als Quencher einen Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus TAMRA, CY-5, DABCYL, und LCR verwendet.
18. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er
  - a) einen Amplifikationsprimer, an den eine Nukleinsäure-Sequenz angehängt ist, die für das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' im Transkript kodiert,
  - b) einen weiteren Amplifikationsprimer,
  - c) Enzyme und Reagenzien zur Durchführung der Amplifikation, #

- d) eine Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls
- e) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel

umfaßt.

19. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß er

- a) einen Amplifikationsprimer, an den eine Nukleinsäure-Sequenz angehängt ist, die für das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' im Transkript kodiert,
- b) einen weiteren Amplifikationsprimer,
- c) Enzyme und Reagenzien zur Durchführung der Amplifikation,
- d) eine Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls
- e) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel

umfaßt.

20. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß er

- a) zwei Amplifikationsprimer,
- b) Enzyme zur Durchführung der Amplifikation,
- c) eine Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls

- d) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel

umfaßt.

21. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß er

- a) zwei Amplifikationsprimer,
- b) Enzyme zur Durchführung der Amplifikation,
- c) eine Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls
- d) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel

umfaßt.

22. Kit nach den Ansprüchen 18 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure RNA, DNA oder ein DNA/RNA-Chimär ist.

23. Kit nach den Ansprüchen 18 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß die an den Primer angehängte Nukleinsäure-Sequenz eine Länge von 1 bis 40 Nukleotiden aufweist.

24. Kit nach den Ansprüchen 18 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß man die Nukleinsäure-Sonde in einer Konzentration von 50 bis 500 nM einsetzt.

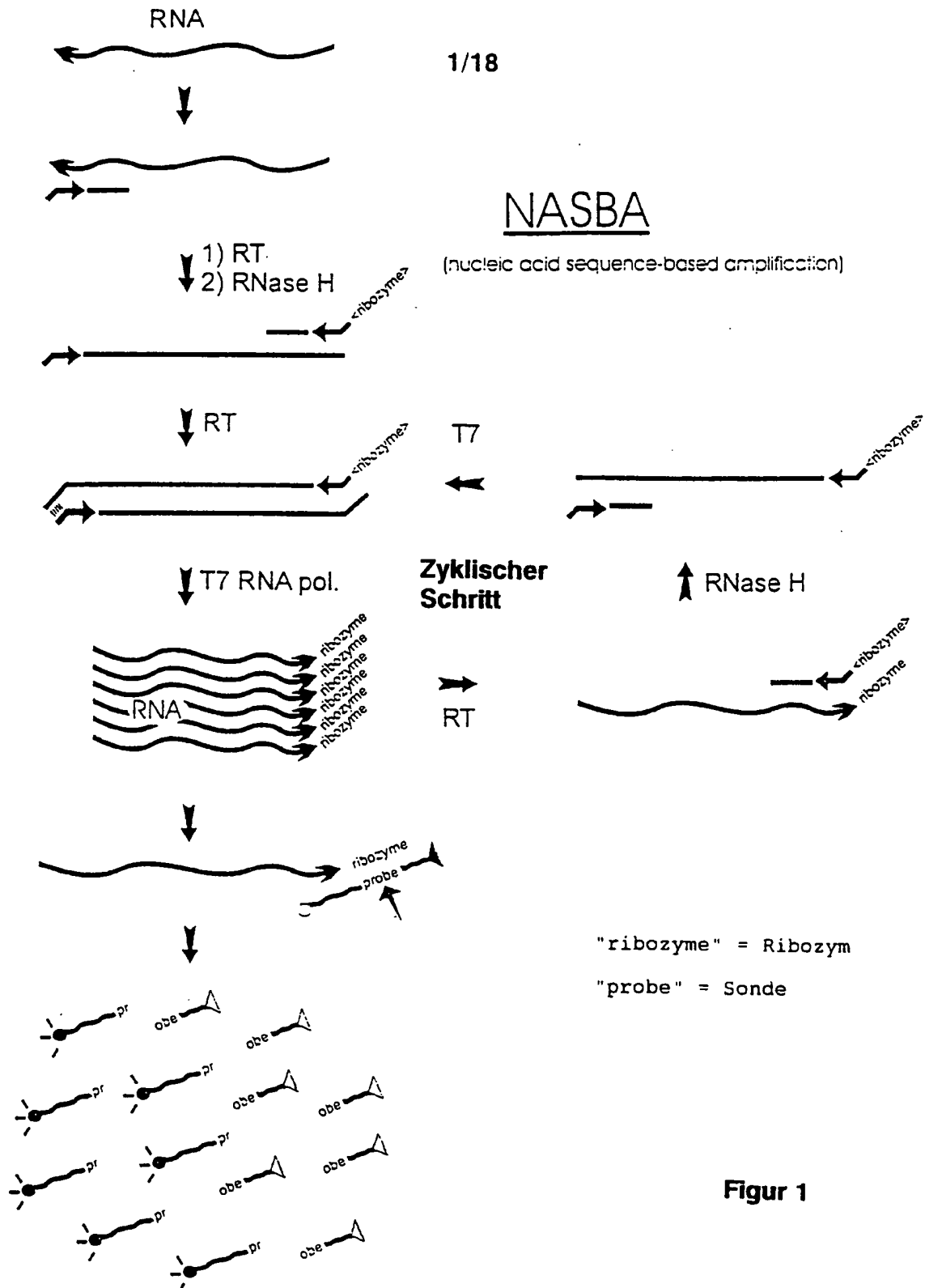
25. Kit nach den Ansprüchen 18 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure-Sonde eine Länge von 25 bis 60 Nukleotiden, vorzugsweise etwa 50 Nukleotide, hat.

26. Kit nach den Ansprüchen 18 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikationsverfahren eine isothermes oder cyclisches Amplifikationsverfahren ist.
27. Kit nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikationsverfahren aus der Gruppe bestehend aus NASBA<sup>®</sup>, TMA, 3SR, oder PCR ausgewählt ist.
28. Kit nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Kit zur Durchführung einer NASBA<sup>®</sup> ist, wobei die Enzyme die Aktivität von Reverse Transkriptase, T7 RNA Polymerase und RNase H aufweisen.
29. Kit nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzyme zur Durchführung der NASBA<sup>®</sup> Reverse Transkriptase, T7 RNA Polymerase und RNase H sind.
30. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Sonde mit einer zur Hybridisierung mit der nachzuweisenden Nukleinsäure geeignete Sequenz, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) oder 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls weitere zur Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel umfaßt.
31. Kit nach den Ansprüchen 18 bis 30, dadurch gekennzeichnet, der Reporter ein Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus FAM, HEX, TET, ALEXA, Texas Red, Light Cycler Red, IRD 700, CY-7, IRD 41 oder La Jolla Blue und der Quencher ein Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus TAMRA, CY-5, DABCYL, und LCR ist.

1/18

NASBA

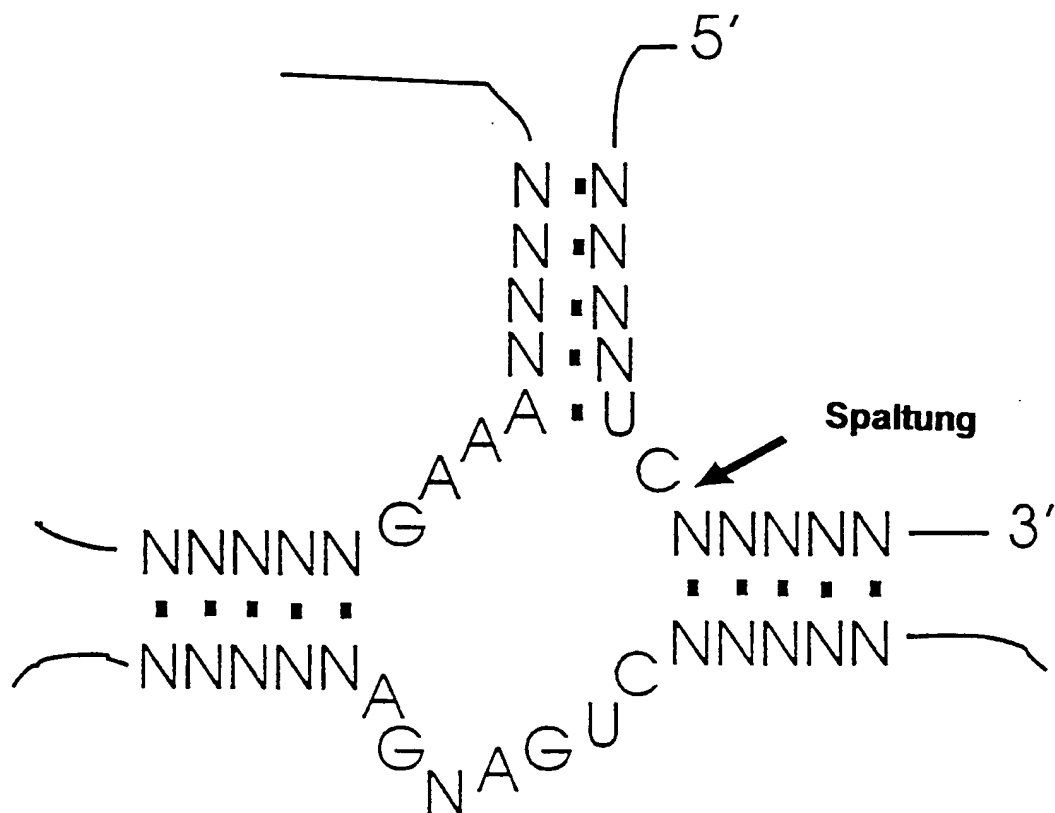
(nucleic acid sequence-based amplification)

**Figur 1**



2/18

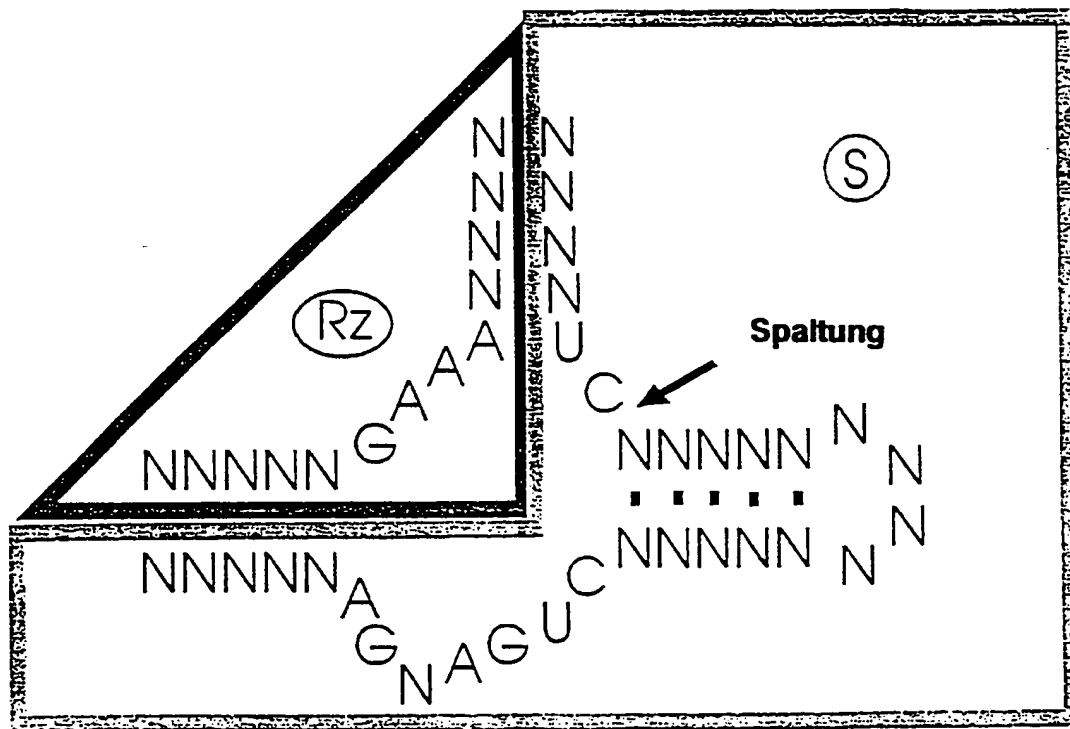
Figur 2A

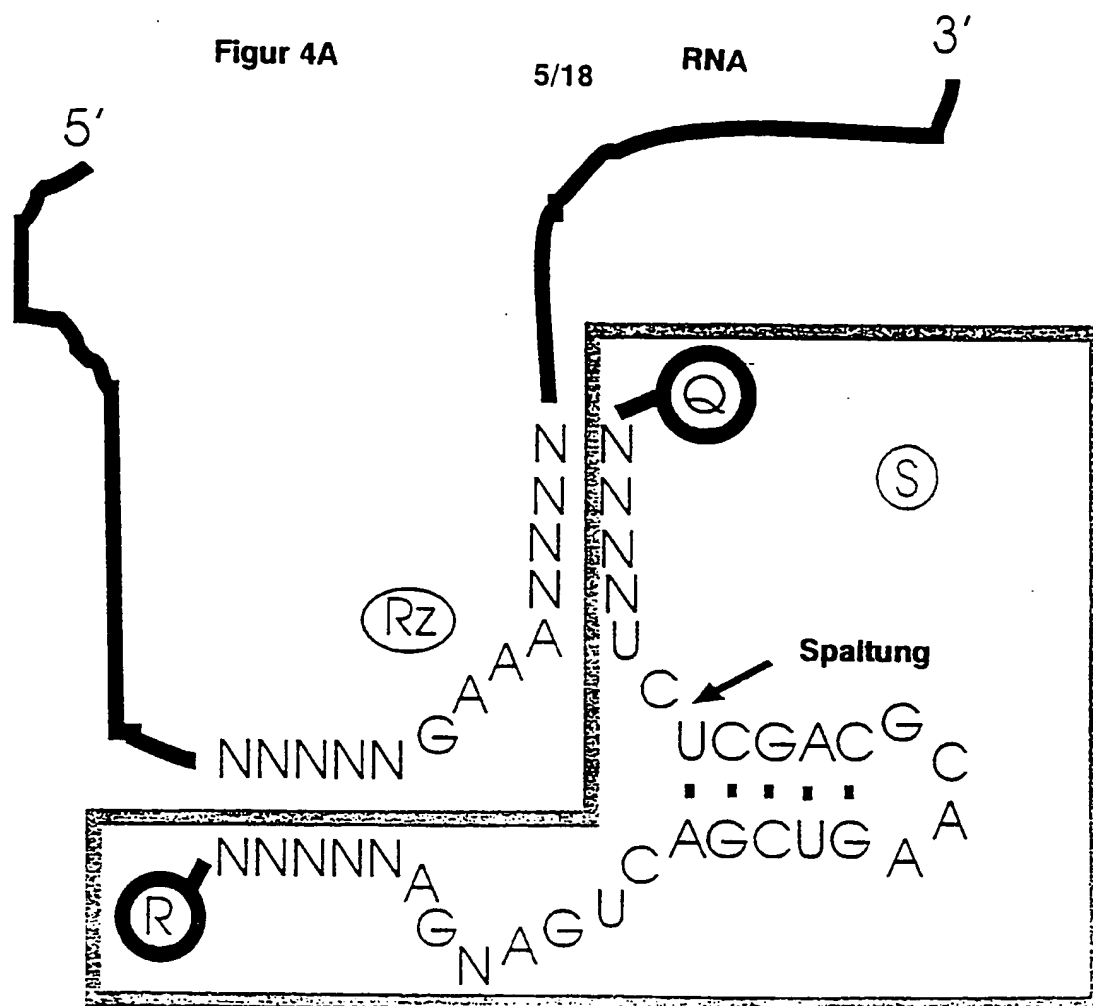




Figur 3

4/18



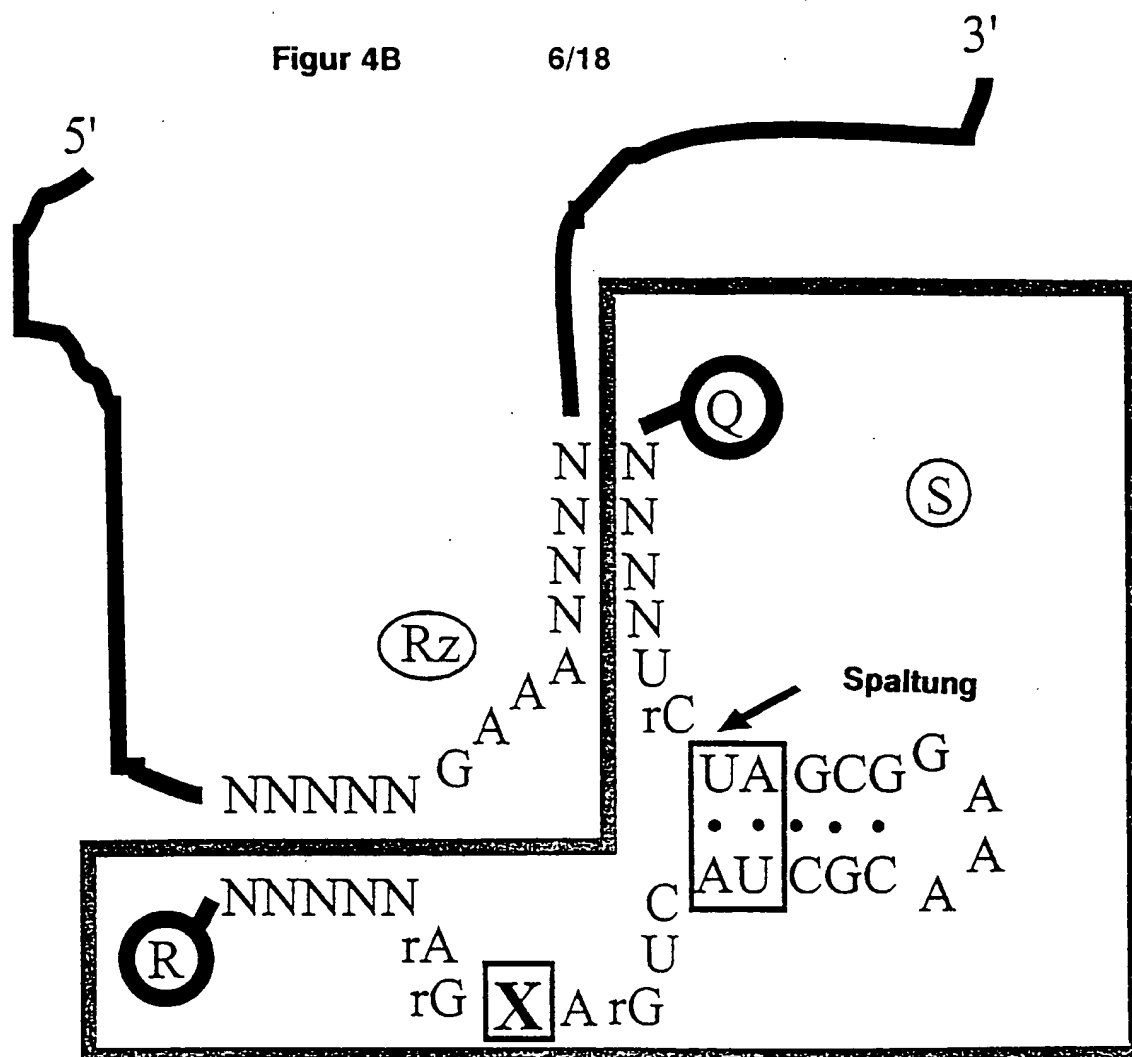


R = FAM  
HEX  
TET  
ALEXA

Q = TAMRA  
CY-5  
DABCYL  
LCR  
etc.

Figur 4B

6/18



R = FAM  
 HEX  
 TET  
 ALEXA

Q = TAMRA  
 CY-5  
 DABCYL  
 LCR

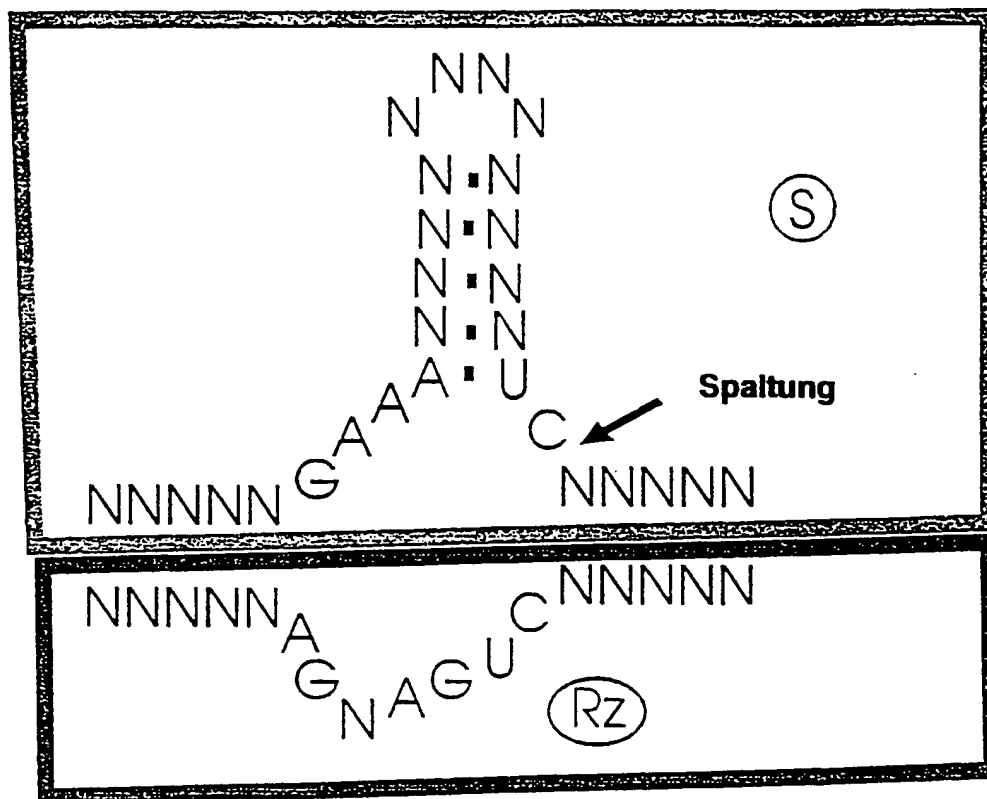
**X = Pyridin-4-on**

**r = essentielle Ribonukleotide**

**wichtig: keine (C,U)-A Dinukleotide im Loop**

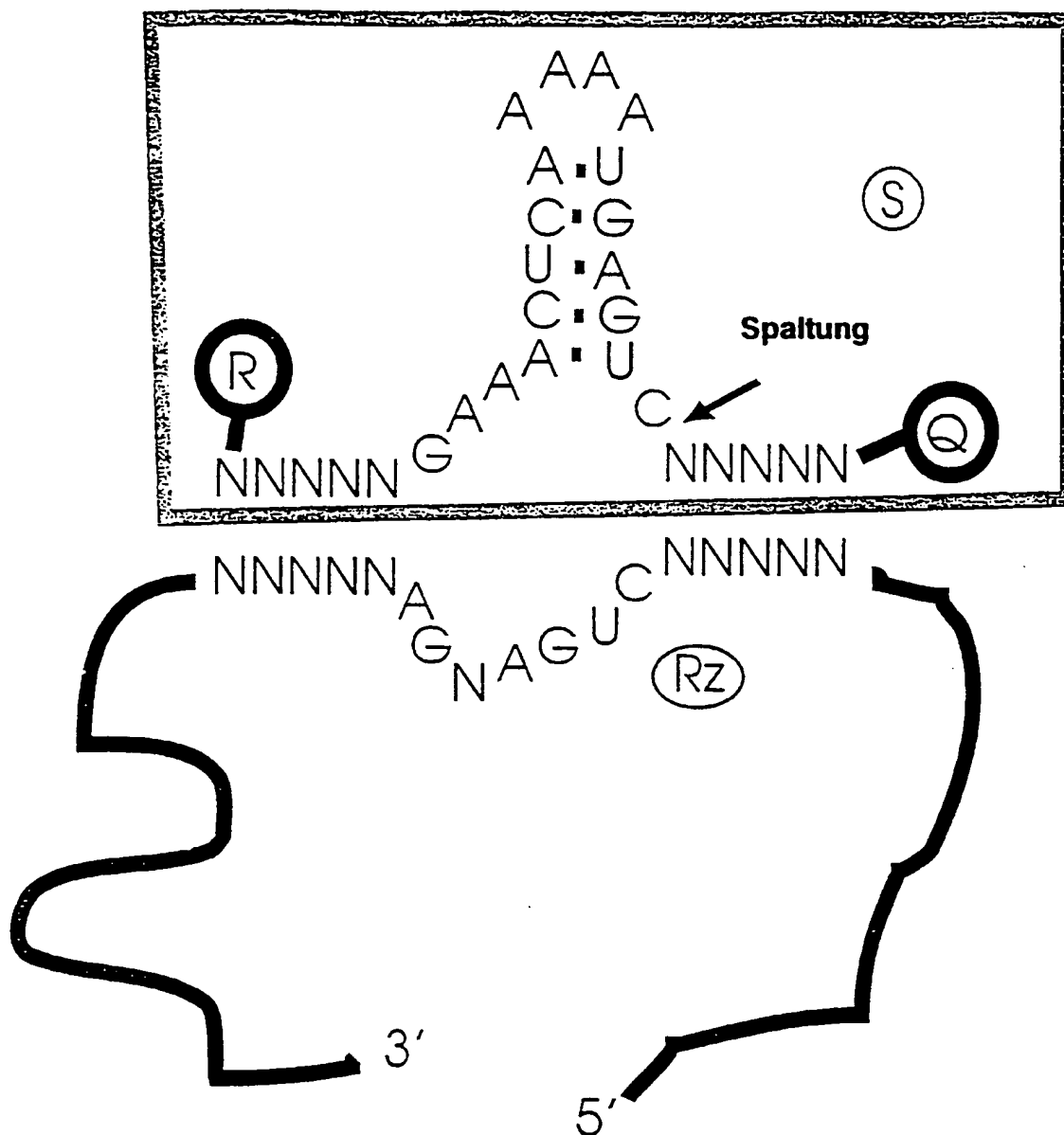
Figur 5

7/18



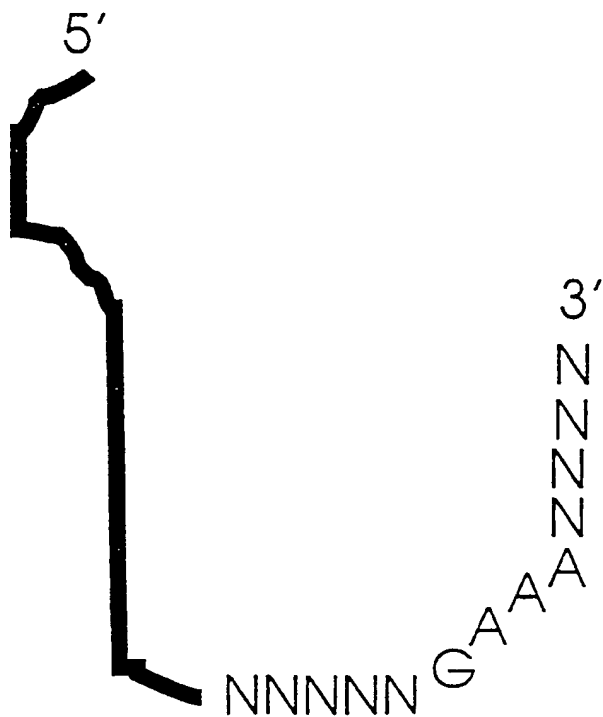
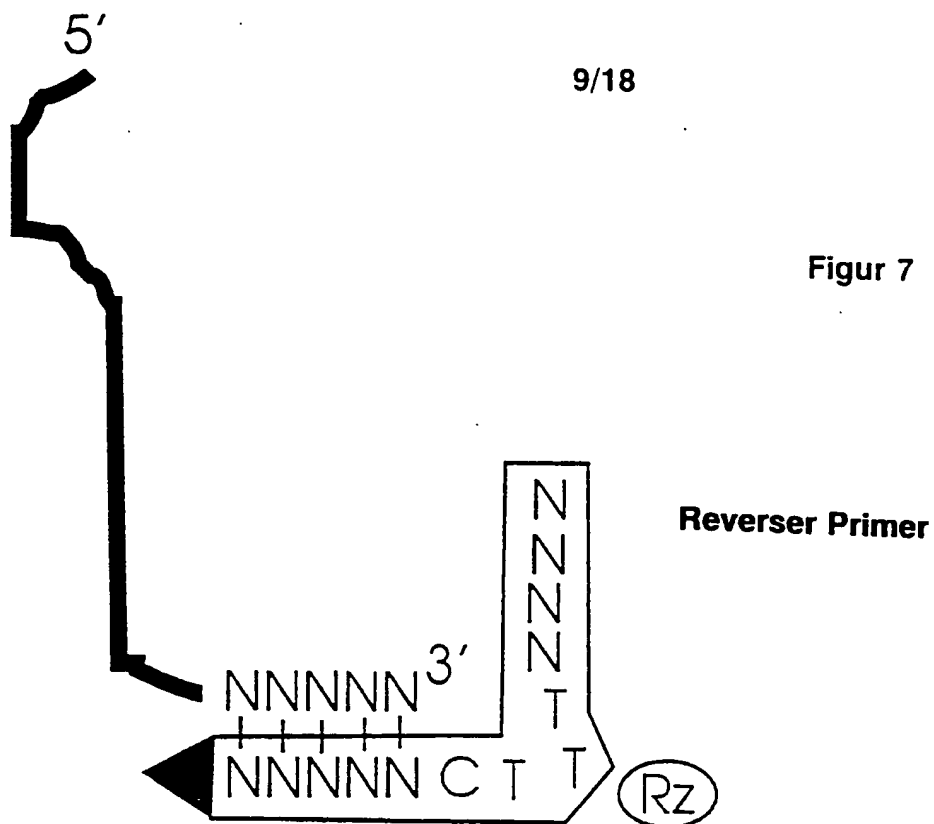
Figur 6

8/18



9/18

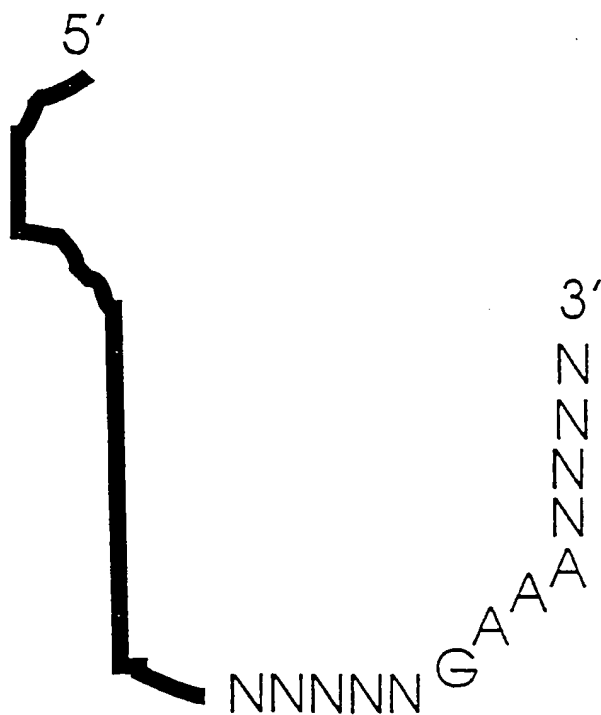
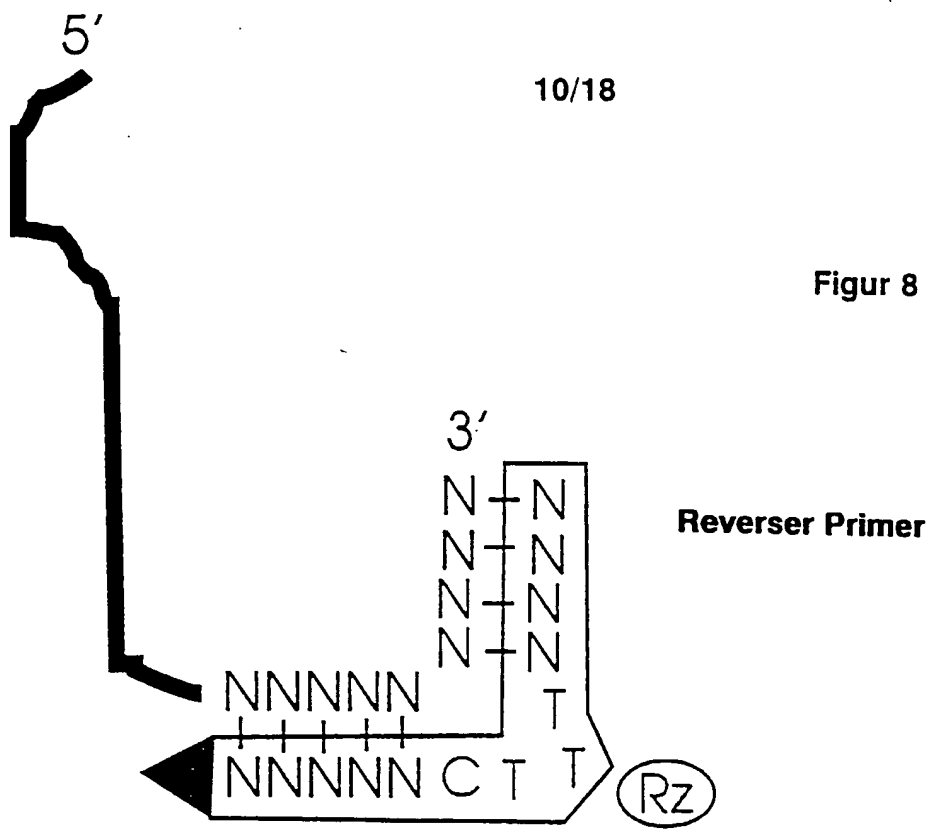
Figur 7





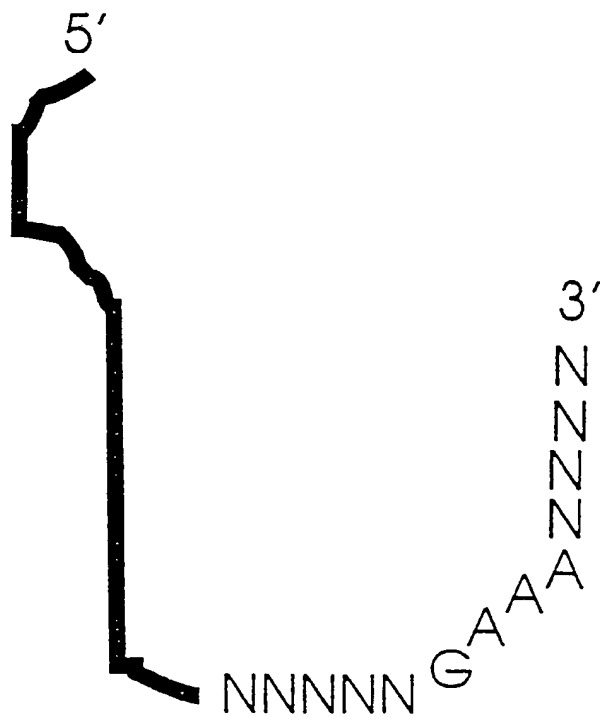
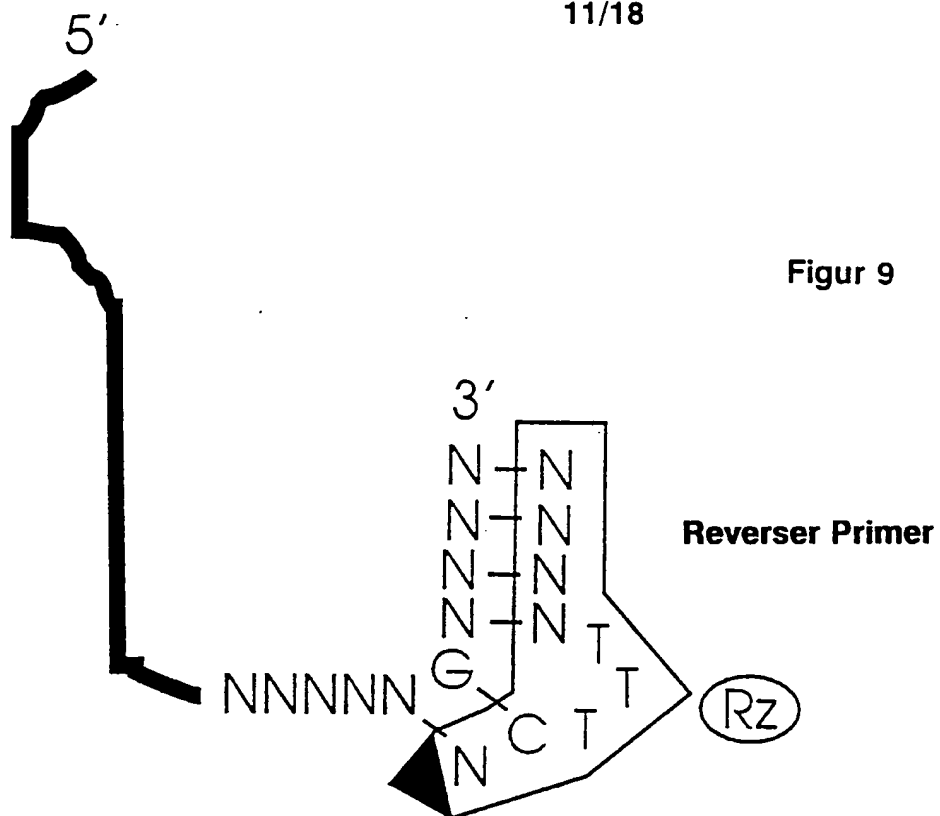
10/18

Figur 8



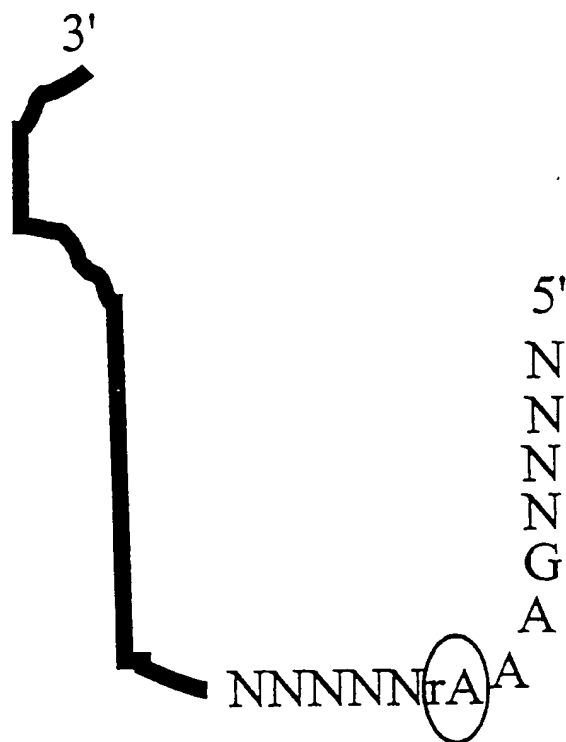
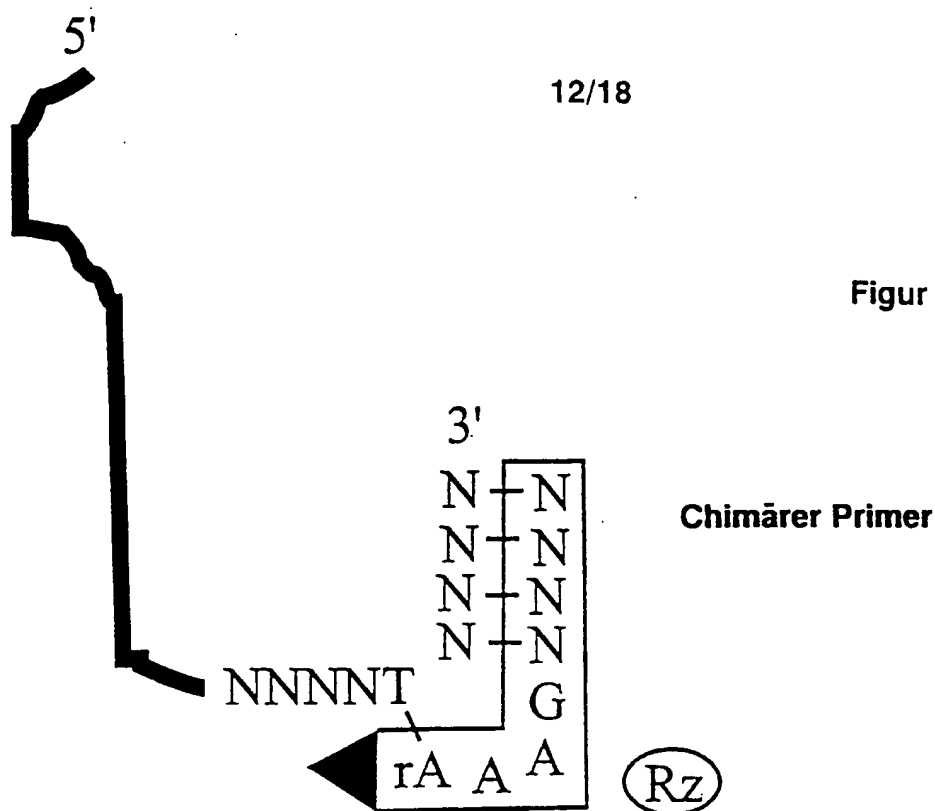
11/18

Figur 9



12/18

Figur 10



13/18

Figur 11

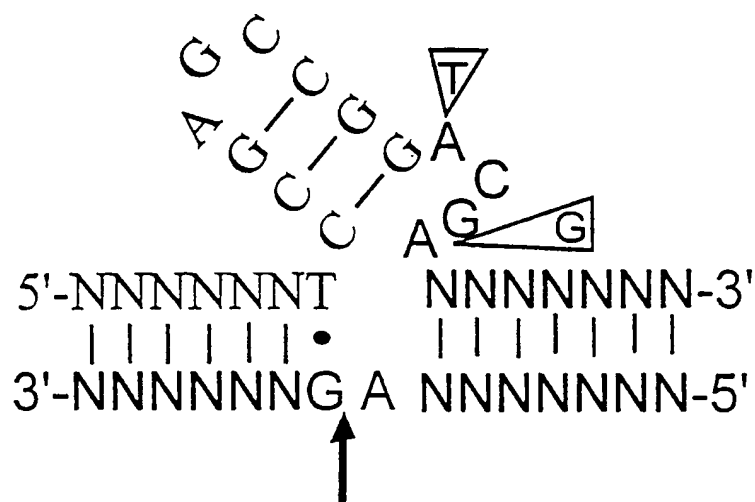
## Chimärer Primer

$$\textcircled{Rz}$$

5'  
N  
N  
N  
N  
G  
A

$$\text{NNNNN}(\text{rA})_A$$

14/18

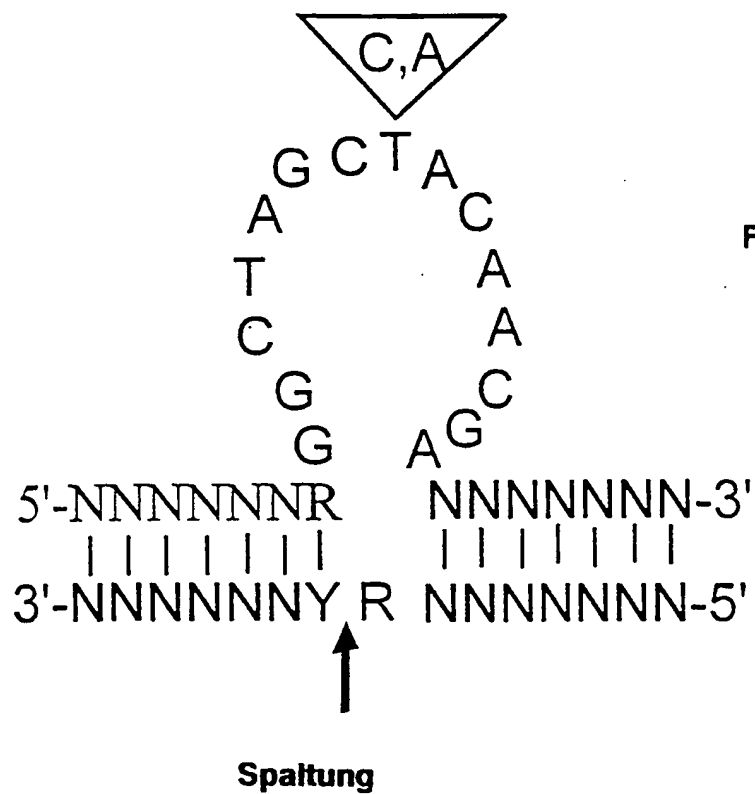


Figur 12

Spaltung

DNA-zyyme: Prototype A

15/18

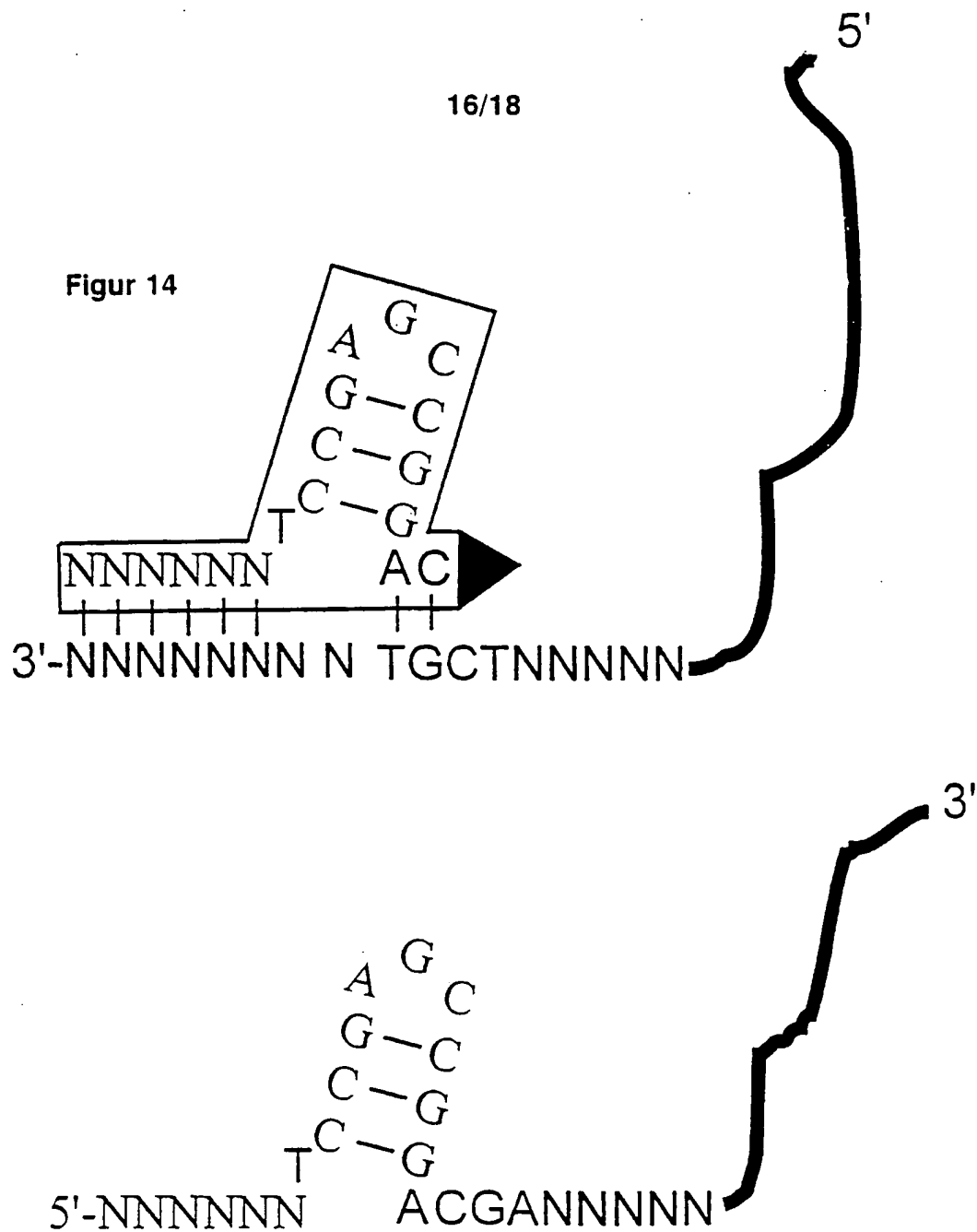


Figur 13

DNA-zyme: Prototype B

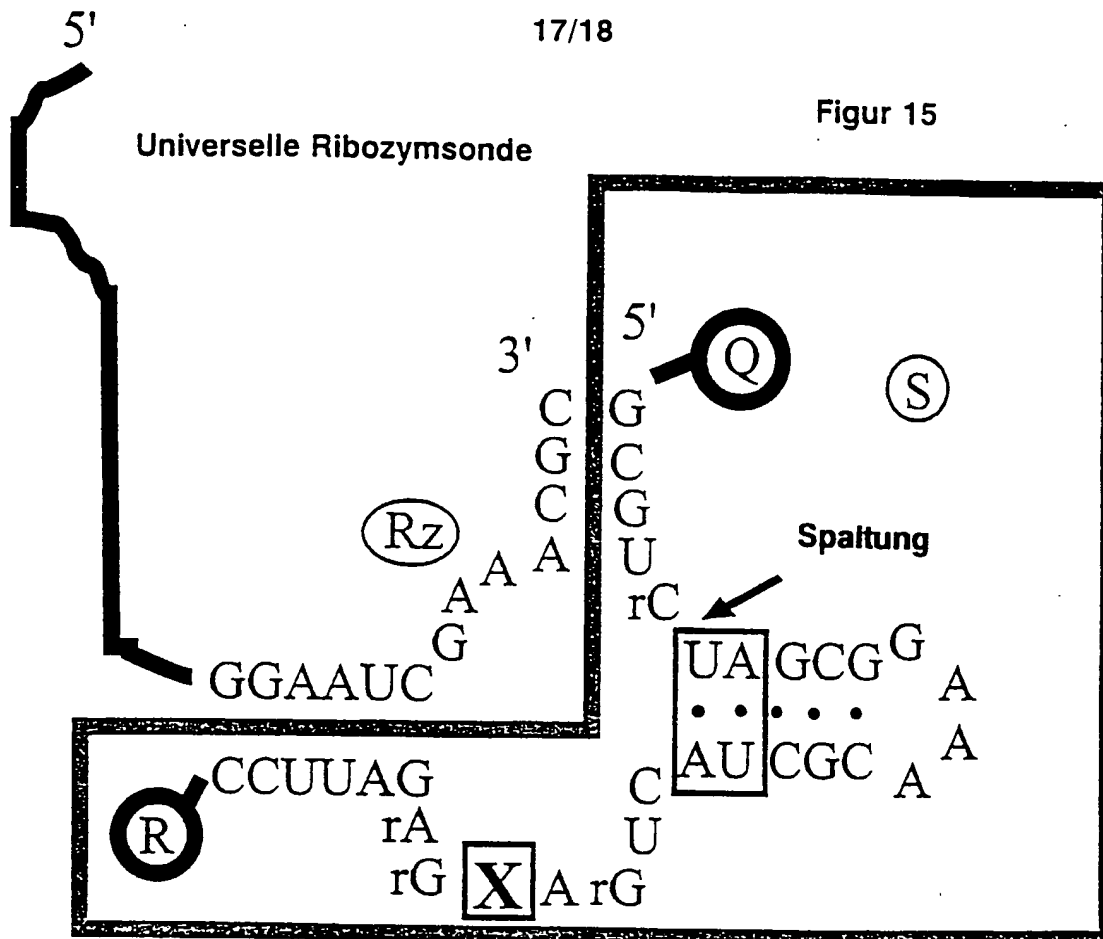
16/18

Figur 14



17/18

Figur 15



R = FAM  
 HEX  
 TET  
 ALEXA

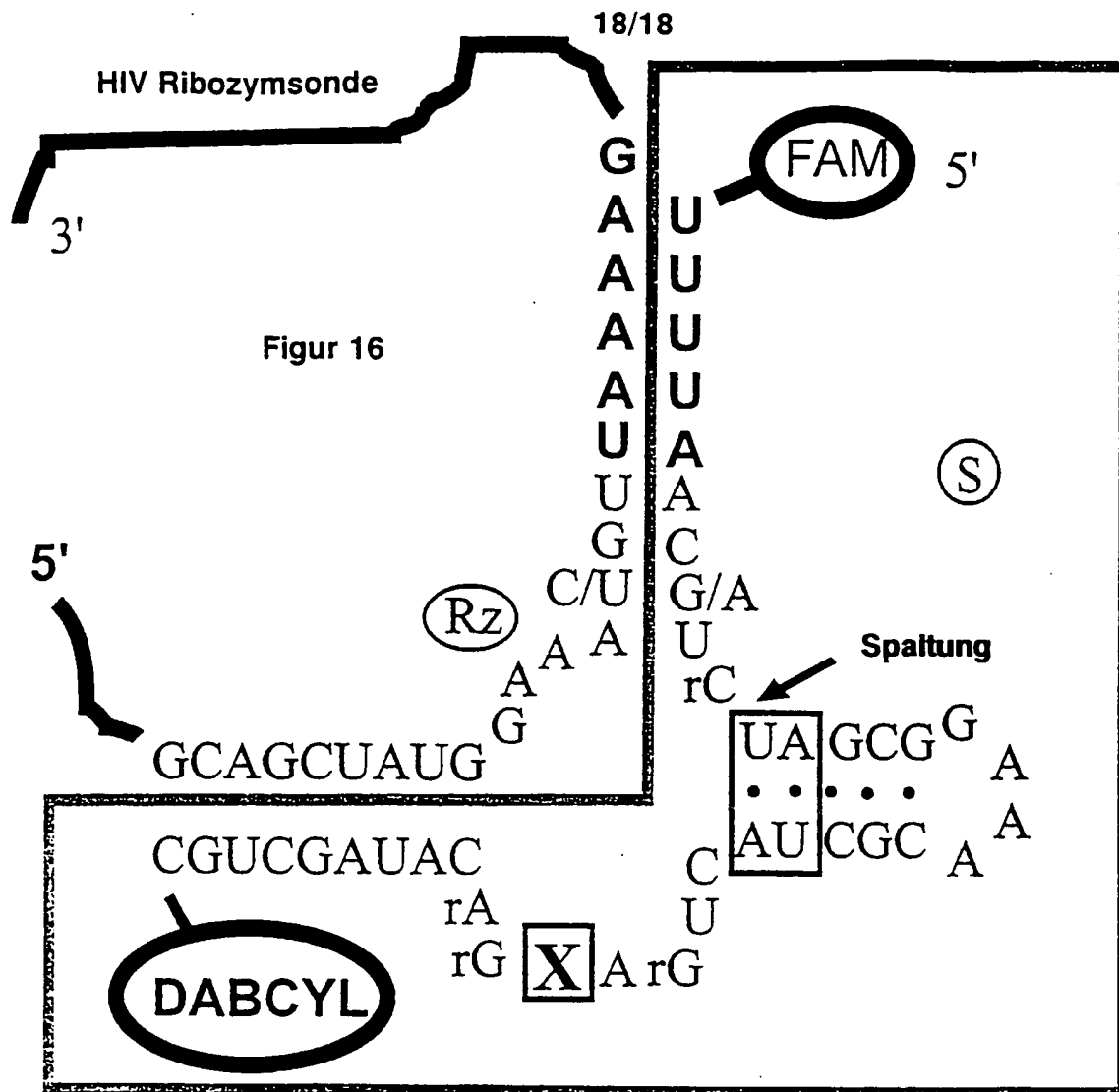
Q = TAMRA  
 CY-5  
 DABCYL  
 LCR  
 etc.

X = Pyridin-4-on

r = essentielle Ribonukleotide

wichtig: keine (C,U)-A Dinukleotide im Loop





**X = Pyridin-4-on**

**r = essentielle Ribonukleotide**

**wichtig: keine (C,U)-A Dinukleotide im Loop**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application  
PCT/EP 99/07127

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 96 27026 A (KRUPP GUIDO ;TIKOCHINSKI YARON (IL); ASHER NATHAN (IL); FRIEDMANN) 6 September 1996 (1996-09-06) the whole document	1-31
Y	--- DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 96-419828 XP002111692 & JP 08 205897 A (NIKON CORP), 13 August 1996 (1996-08-13) abstract	1-31
Y	--- WO 90 14439 A (GENE TRAK SYSTEMS) 29 November 1990 (1990-11-29) the whole document --- -/--	1-31

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 March 2000

Date of mailing of the international search report

07/04/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hagenmaier, S

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application  
PCT/EP 99/07127

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HANNE A ET AL: "Fluorescence energy transfer (FRET) to follow ribozyme reactions in real time" NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES, US, MARCEL DEKKER, INC, vol. 17, no. 9/11, 1998, pages 1835-1850-1850, XP002111690 ISSN: 0732-8311 the whole document ----	1-31
A	WO 94 13833 A (INNOVIR LAB INC) 23 June 1994 (1994-06-23) the whole document ----	
A	EP 0 525 882 A (AKZO NV) 3 February 1993 (1993-02-03) See claim 6 the whole document ----	
A	LEONE ET AL: "MOLECULAR BEACON PROBES COMBINED WITH AMPLIFICATION BY NASBA ENABLE HOMOGENEOUS, REAL-TIME DETECTION OF RNA" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 26, no. 9, 1998, pages 2150-2155, XP002134179 the whole document ----	
A	EP 0 707 076 A (AMOCO CORP) 17 April 1996 (1996-04-17) the whole document ----	
A	WO 96 17086 A (SCRIPPS RESEARCH INST ; JOYCE GERALD F (US); BREAKER RONALD R (US)) 6 June 1996 (1996-06-06) the whole document ----	
P, X	WO 99 47704 A (JENNE ANDREAS ; FAMULOK MICHAEL (DE)) 23 September 1999 (1999-09-23) the whole document ----	1-31
P, X	JENNE A: "REAL-TIME CHARACTERIZATION OF RIBOZYMES BY FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER (FRET)" ANGEWANDTE CHEMIE. INTERNATIONAL EDITION, DE, VERLAG CHEMIE. WEINHEIM, vol. 38, no. 9, 3 May 1999 (1999-05-03), pages 1300-1303-1303, XP002111691 ISSN: 0570-0833 the whole document -----	1-31

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 99/07127

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9627026 A	06-09-1996	IL 112799 A	12-03-1999
		AU 697317 B	01-10-1998
		AU 5416596 A	18-09-1996
		BR 9607267 A	15-12-1998
		CA 2213622 A	06-09-1996
		CN 1183812 A	03-06-1998
		EP 0822992 A	11-02-1998
		JP 11500917 T	26-01-1999
		NO 973926 A	08-10-1997
JP 8205897 A	13-08-1996	NONE	
WO 9014439 A	29-11-1990	US 5112734 A	12-05-1992
		AU 5674590 A	18-12-1990
		DE 69018631 D	18-05-1995
		DE 69018631 T	10-08-1995
		EP 0473693 A	11-03-1992
		JP 4506748 T	26-11-1992
WO 9413833 A	23-06-1994	AU 675482 B	06-02-1997
		AU 5739694 A	04-07-1994
		EP 0681613 A	15-11-1995
		JP 8507202 T	06-08-1996
		US 5589332 A	31-12-1996
EP 0525882 A	03-02-1993	AU 670535 B	25-07-1996
		AU 2071892 A	11-03-1993
		CA 2075147 A	03-02-1993
		FI 923447 A	03-02-1993
		JP 5219999 A	31-08-1993
		US 5834255 A	10-11-1998
		ZA 9205631 A	28-04-1993
EP 0707076 A	17-04-1996	DE 68926484 D	20-06-1996
		DE 68926484 T	05-12-1996
		EP 0361983 A	04-04-1990
		JP 2257898 A	18-10-1990
		US 5763171 A	09-06-1998
		US 5472840 A	05-12-1995
WO 9617086 A	06-06-1996	US 5807718 A	15-09-1998
		AU 710747 B	30-09-1999
		AU 4595096 A	19-06-1996
		BR 9510003 A	21-10-1997
		CA 2205382 A	06-06-1996
		CN 1173207 A	11-02-1998
		EP 0792375 A	03-09-1997
		FI 972333 A	31-07-1997
		HU 77576 A	29-06-1998
		JP 10510165 T	06-10-1998
		NO 972483 A	04-08-1998
WO 9947704 A	23-09-1999	NONE	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 99/07127

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 96 27026 A (KRUPP GUIDO ;TIKUCHINSKI YARON (IL); ASHER NATHAN (IL); FRIEDMANN) 6. September 1996 (1996-09-06) das ganze Dokument ---	1-31
Y	DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 96-419828 XP002111692 & JP 08 205897 A (NIKON CORP), 13. August 1996 (1996-08-13) Zusammenfassung ---	1-31
Y	WO 90 14439 A (GENE TRAK SYSTEMS) 29. November 1990 (1990-11-29) das ganze Dokument ---	1-31
	--- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

29. März 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

07/04/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hagenmaier, S

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	HANNE A ET AL: "Fluorescence energy transfer (FRET) to follow ribozyme reactions in real time" NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES, US, MARCEL DEKKER, INC, Bd. 17, Nr. 9/11, 1998, Seiten 1835-1850-1850, XP002111690 ISSN: 0732-8311 das ganze Dokument ---	1-31
A	WO 94 13833 A (INNOVIR LAB INC) 23. Juni 1994 (1994-06-23) das ganze Dokument ---	
A	EP 0 525 882 A (AKZO NV) 3. Februar 1993 (1993-02-03) See claim 6 das ganze Dokument ---	
A	LEONE ET AL.: "MOLECULAR BEACON PROBES COMBINED WITH AMPLIFICATION BY NASBA ENABLE HOMOGENEOUS, REAL-TIME DETECTION OF RNA" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 26, Nr. 9, 1998, Seiten 2150-2155, XP002134179 das ganze Dokument ---	
A	EP 0 707 076 A (AMOCO CORP) 17. April 1996 (1996-04-17) das ganze Dokument ---	
A	WO 96 17086 A (SCRIPPS RESEARCH INST ; JOYCE GERALD F (US); BREAKER RONALD R (US)) 6. Juni 1996 (1996-06-06) das ganze Dokument ---	
P, X	WO 99 47704 A (JENNE ANDREAS ; FAMULOK MICHAEL (DE)) 23. September 1999 (1999-09-23) das ganze Dokument ---	1-31
P, X	JENNE A: "REAL-TIME CHARACTERIZATION OF RIBOZYMES BY FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER (FRET)" ANGEWANDTE CHEMIE. INTERNATIONAL EDITION, DE, VERLAG CHEMIE. WEINHEIM, Bd. 38, Nr. 9, 3. Mai 1999 (1999-05-03), Seiten 1300-1303-1303, XP002111691 ISSN: 0570-0833 das ganze Dokument -----	1-31

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 99/07127

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9627026 A	06-09-1996	IL 112799 A AU 697317 B AU 5416596 A BR 9607267 A CA 2213622 A CN 1183812 A EP 0822992 A JP 11500917 T NO 973926 A	12-03-1999 01-10-1998 18-09-1996 15-12-1998 06-09-1996 03-06-1998 11-02-1998 26-01-1999 08-10-1997
JP 8205897 A	13-08-1996	KEINE	
WO 9014439 A	29-11-1990	US 5112734 A AU 5674590 A DE 69018631 D DE 69018631 T EP 0473693 A JP 4506748 T	12-05-1992 18-12-1990 18-05-1995 10-08-1995 11-03-1992 26-11-1992
WO 9413833 A	23-06-1994	AU 675482 B AU 5739694 A EP 0681613 A JP 8507202 T US 5589332 A	06-02-1997 04-07-1994 15-11-1995 06-08-1996 31-12-1996
EP 0525882 A	03-02-1993	AU 670535 B AU 2071892 A CA 2075147 A FI 923447 A JP 5219999 A US 5834255 A ZA 9205631 A	25-07-1996 11-03-1993 03-02-1993 03-02-1993 31-08-1993 10-11-1998 28-04-1993
EP 0707076 A	17-04-1996	DE 68926484 D DE 68926484 T EP 0361983 A JP 2257898 A US 5763171 A US 5472840 A	20-06-1996 05-12-1996 04-04-1990 18-10-1990 09-06-1998 05-12-1995
WO 9617086 A	06-06-1996	US 5807718 A AU 710747 B AU 4595096 A BR 9510003 A CA 2205382 A CN 1173207 A EP 0792375 A FI 972333 A HU 77576 A JP 10510165 T NO 972483 A	15-09-1998 30-09-1999 19-06-1996 21-10-1997 06-06-1996 11-02-1998 03-09-1997 31-07-1997 29-06-1998 06-10-1998 04-08-1998
WO 9947704 A	23-09-1999	KEINE	